



IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

IFW

Application of:

Attorney Docket No.: 026073-00006

ZOLLO

Confirmation No.

Application Serial No. 10/582,115

Examiner:

Filing Date: June 8, 2006

Art Unit:

For: Use of Enzymatic Inhibitors of H-Prune for the Prevention and Treatment of the Metastases of Tumours Overexpressing H-Prune

**CLAIM FOR PRIORITY**

Commissioner for Patents  
P.O. Box 1450  
Alexandria, Virginia 22313-1450

October 6, 2006

Sir:

The benefit of the filing date of the following prior foreign application filed in the following foreign country is hereby requested for the above-identified patent application and the priority provided in 35 U.S.C. §119 is hereby claimed:

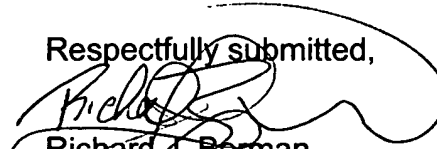
**RM 2003 A 000572 filed on December 11, 2003**

In support of this claim, certified copy of said original foreign application is filed herewith.

It is requested that the file of this application be marked to indicate that the requirements of 35 U.S.C. §119 have been fulfilled and that the Patent and Trademark Office kindly acknowledge receipt of this document.

Please charge any fee deficiency or credit any overpayment with respect to this paper to Deposit Account No. 01-2300.

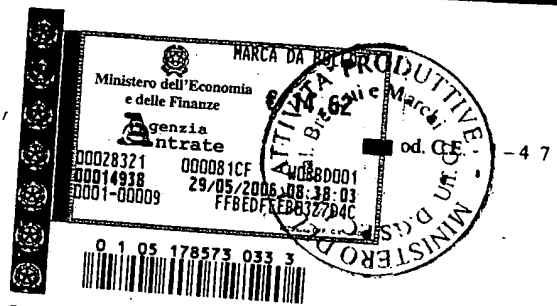
Respectfully submitted,

  
Richard J. Berman  
Registration No. 39,107

Customer No.: 004372  
Arent Fox PLLC  
1050 Connecticut Avenue, N.W., Suite 400  
Washington, D.C. 20036-5339  
Tel: (202) 857-6000/Fax: (202) 857-6395

RJB:pd  
Enclosure: Priority Document (1)

TECH/457546.1



# Ministero dello Sviluppo Economico

Direzione Generale per lo Sviluppo Produttivo e la Competitività

Ufficio Italiano Brevetti e Marchi

Ufficio G2

Autenticazione di copia di documenti relativi alla domanda di brevetto per:  
INVENZIONE INDUSTRIALE N. RM 2003 A 000572

Si dichiara che l'unità copia è conforme ai documenti originali  
depositati con la domanda di brevetto sopra specificata, i cui dati  
risultano dall'accluso processo verbale di deposito.

Si compone di pagg. 88.

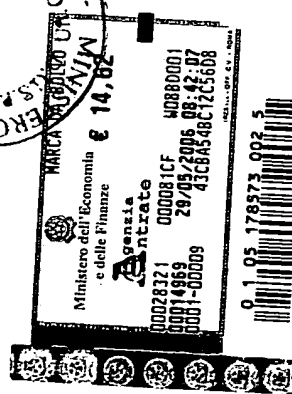
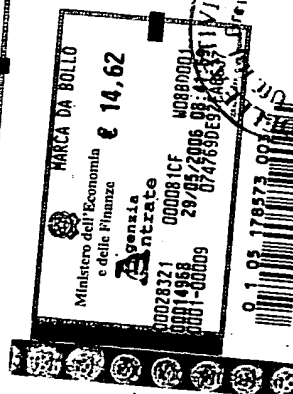
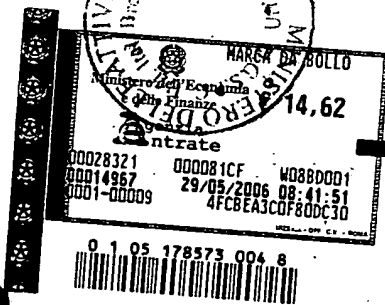
Roma, li..... 5 LUG. 2006.

IL FUNZIONARIO

.....Giampietro Carlotto.....

*Giampietro Carlotto*

CERTIFIED COPY OF  
PRIORITY DOCUMENT



BEST AVAILABLE COPY

## A. RICHIEDENTE(I)

1) Denominazione Fondazione Telethon N.G. ☒ ☒  
 Residenza Roma, RM codice 0 4 8 7 9 7 8 1 0 0 5  
 2) Denominazione \_\_\_\_\_  
 Residenza \_\_\_\_\_ codice: \_\_\_\_\_

## B. RAPPRESENTANTE DEL RICHIEDENTE PRESSO L'U.I.B.M.

Cognome e nome GITTO Serena ed altri Cod. fiscale \_\_\_\_\_  
 Denominazione studio di appartenenza Ing. Barzanò & Zanardo Roma S.p.A.  
 Via Piemonte n. 2 6 città ROMA Cap 0 0 1 8 7 (prov) R M

## C. DOMICILIO ELETTIVO destinatario

Ing. Barzanò & Zanardo Roma S.p.A.  
 Via Piemonte n. 2 6 città ROMA Cap 0 0 1 8 7 (prov) R M

## D. TITOLO

classe proposta (sez./cl/scl) \_\_\_\_\_ gruppo/sottogruppo \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_

"Uso di inibitori enzimatici di h-PRUNE per la prevenzione ed il trattamento delle metastasi dei tumori iperesprimanti h-PRUNE".

ANTICIPATA ACCESSIBILITÀ AL PUBBLICO: SI ☐ NO ☒ SE ISTANZA: DATA \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ N° PROTOCOLLO \_\_\_\_\_

## E. INVENTORI DESIGNATI

cognome e nome

cognome e nome

1) ZOLLO Massimo  
 2) \_\_\_\_\_

3) \_\_\_\_\_  
 4) \_\_\_\_\_

## F. PRIORITÀ

nazione o organizzazione

Tipo di priorità

numero di domanda

data di deposito

Allegato S/R

1) \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_  
 2) \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_

## SCIOGLIMENTO RISERVE

Data N. Protocollo

/ / /  
 / / /

## G. CENTRO ABILITATO DI RACCOLTA COLTURE DI MICRORGANISMI, denominazione

## H. ANNOTAZIONI SPECIALI

NESSUNA

## DOCUMENTAZIONE ALLEGATA

N. es. n. pag. 7 6 riassunto con disegno principale, descrizione e rivendicazioni (obbligatorio 1 esemplare)  
 Doc. 1) 1 \_\_\_\_\_  
 2) 1 \_\_\_\_\_ n. tav. 1 0 disegno  
 Doc. 3) 1 \_\_\_\_\_ Lettera d'incarico  
 Doc. 4) 1 \_\_\_\_\_ designazione inventore  
 Doc. 5) \_\_\_\_\_ documenti di priorità con traduzione in italiano  
 Doc. 6) \_\_\_\_\_ autorizzazione o atto di cessione  
 Doc. 7) \_\_\_\_\_ nominativo completo del richiedente

## SCIOGLIMENTO RISERVE

Data N° Protocollo

/ / /  
 / / /

Confronta singole priorità

/ / /  
 / / /

8) attestati di versamento, totale Euro QUATTROCENTOSETTANTADUE /56

obbligatorio  
 UN MANDATARIO  
 per se e per gli altri  
Serena Gitto  
 (N° d'istr. 962B)

COMPILATO IL 1 1 / 1 2 / 2 0 0 3

FIRMA DEL(I)

RICHIEDENTE(I)

Fondazione Telethon

CONTINUA SÌ/NO N O

Ing. Barzanò & Zanardo Roma S.p.A.

DEL PRESENTE ATTO SI RICHIEDE COPIA AUTENTICA SÌ/NO S I

CAMERA di COMMERCIO, IND. ART. e AGR. - RM2003 A 000572

ROMA

codice 5 8

VERBALE DI DEPOSITO NUMERO DI DOMANDA \_\_\_\_\_

Reg. A

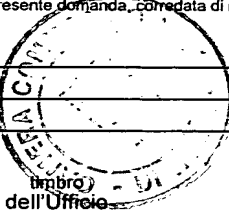
L'anno DUEMILATREil giorno UNDICI

del mese di

DICEMBRE

Il(i) richiedente(i) sopraindicato(i) ha(hanno) presentato a me sottoscritto la presente domanda, corredata di n. 0 0 fogli aggiuntivi per la concessione del brevetto soprariportato.

ANNOTAZIONI VARIE DELL'UFFICIALE  
 ROGANTE



L'UFFICIALE ROGANTE  
UFFICIALE ROGANTE  
Silvia Altieri

IL DEPOSITANTE

Gitto

RIASSUNTO INVENZIONE CON DISEGNO PRINCIPALE

PROSPETTO A

NUMERO DOMANDA

REG. A

DATA DI DEPOSITO 11/12/2003

NUMERO BREVETTO

DATA DI RILASCIO //

A. RICHIEDENTE(I)

1) Denominazione Fondazione Telethon

2) Denominazione

**RM 2003 A 000572**

D. TITOLO

"Uso di inibitori enzimatici di h-PRUNE per la prevenzione ed il trattamento delle metastasi dei tumori iperesprimanti h-PRUNE".

Classe proposta (sez./cl./scl/)

(gruppo/sottogruppo)

L. RIASSUNTO

L'invenzione concerne l'uso di inibitori enzimatici di h-PRUNE e loro relativo metodo di screening per la prevenzione ed il trattamento delle metastasi dei tumori iperesprimanti h-PRUNE e relativi kit diagnostici per la prognosi di dette metastasi.

M.

a corredo di una domanda di brevetto per invenzione industriale dal titolo: “Uso di inibitori enzimatici di h-PRUNE per la prevenzione ed il trattamento delle metastasi dei tumori iperesprimenti h-PRUNE ”

Inventori: Massimo ZOLLO

\* \* \*

SECRET

Più in particolare l'invenzione si riferisce all'impiego di inibitori enzimatici di h-PRUNE per la prevenzione ed il trattamento delle metastasi dei tumori alla mammella, dei sarcomi, dei melanomi, dei neuroblastomi e al relativo metodo di screening di detti inibitori. Inoltre l'invenzione si riferisce ulteriormente ad un kit diagnostico di metastasi di detti tumori.

La proteina PRUNE umana (h-PRUNE) appartiene alla superfamiglia delle DHH, che include diverse fosfoesterasi, come la RecJ nucleare di derivazione batterica e le pirofosfatasi da lievito e batteri (Aravind et al., 1998).

La superfamiglia di DHH può essere divisa in due gruppi principali sulla base di un motivo C-terminale che è molto ben conservato all'interno di ciascun gruppo, ma non tra i diversi gruppi.

Tutti i membri di questa superfamiglia posseggono quattro altri motivi che contengono residui amminoacidici carichi altamente conservati considerati responsabili di legami ionici e che catalizzano la reazione di fosfoesterificazione. La principale caratteristica di questi è il terzo motivo, contraddistinto dal segno DHH (Asp-His-His), in base al quale è stata soprannominata questa superfamiglia.

La proteina Recj è una proteina di riparazione del DNA e, insieme ad altre proteine nucleari e proteine batteriche poco caratterizzate, appartiene al primo gruppo; PRUNE e le polifosfatasi appartengono al secondo gruppo.

Il gene PRUNE di *Drosophila* è stato originariamente caratterizzato sulla base del suo fenotipo mutante che mostrava colore degli occhi porpora-brunastro dovuto alla riduzione di drosopterine, in contrasto con gli occhi rosso brillante dell'insetto wild-type (Timmons et al., 1996). I mutanti omozigoti PRUNE sono vitali e fertili, ma sviluppano tumori pseudo-melanotici diventando letali in presenza di almeno una copia singola di mutazione che interferisce con la formazione corretta del disco immaginale che darà origine all'ala (awd/K-pn; anche nominato Killer of PRUNE).

Gli umani codificano fino a otto ortologi del gene awd (nm23s), almeno quattro dei quali codificano per nucleoside difosfato chinasi attive (NDPKs) che catalizzano il trasferimento del gruppo fosfato da un nucleoside trifosfato a un nucleoside difosfato (Lombardi et al., 2000).

Numerosi tumori e cellule ad alto tasso di proliferazione

iperesprimono mRNA corrispondente di nm23-H1 e relativa proteina, e in molti casi questa iperespressione è legata ai primi stadi del tumore. Il cancro alla mammella è una patologia complessa molto difficile da gestire a livello clinico per la sua vasta eterogeneità e differente possibilità di risposta al trattamento (Keen et al., 2003). L'aumentata conoscenza dei meccanismi molecolari alla base della genesi dei tumori ha consentito di identificare un numero crescente di biomarker da correlare alla prognosi di diversi tipi di tumori in diversi stadi dell'evoluzione della patologia, per indirizzare la scelta del trattamento terapeutico più adeguato (Keen et al., 2003, Domchek et al., 2002).

Tra i fattori di prognosi utilizzati ad oggi nei casi di tumore alla mammella primario sono inclusi, ad esempio, il coinvolgimento dei linfonodi, l'esame istologico, la grandezza del tumore, lo status dei recettori degli estrogeni e del progesterone, l'indice di proliferazione, il grado istologico o nucleare (Kuru et al., 2003, Morabito et al., 2003). Sarebbe utile poter disporre di nuove molecole coinvolte nei processi successivi di trasformazione, invasione e metastasi, da utilizzare come marker per la prognosi degli stadi successivi nell'evoluzione della patologia tumorale.

Nel cancro alla mammella e nei melanomi, l'alta espressione di nm23-H1 umana è associata con una diminuzione del potenziale metastatico (Florenes et al., 1992). Nel caso specifico del cancro alla mammella, la distribuzione delle metastasi è responsabile di tutti i decessi per tumore.

Per diventare invasive, le cellule tumorali hanno bisogno di

cambiare le loro proprietà adesive, perdere il contatto con altre cellule nel tumore primario e instaurare nuovi contatti con la matrice extracellulare di cellule ospiti dei tessuti che esse invadono. In questo contesto la modulazione della attività di proteasi che si esplica intorno alle cellule tumorali gioca un ruolo critico. Per migrare dal tumore primario e per fuoriuscire dal torrente circolatorio per colonizzare gli organi secondari, le cellule tumorali hanno anche la necessità di acquisire funzioni di motilità.

Ad oggi diversi geni soppressori di metastasi sono stati isolati e caratterizzati (Steeg et al., 2003). All'interno di questo gruppo, nm23 è noto indurre una diminuzione della motilità cellulare quando viene iperespresso in cellule tumorali della mammella (Freije et al., 1997, Hartsough et al., 2001, Freije et al., 1997), influenzare la colonizzazione indipendente dall'ancoraggio e indurre il differenziamento (Kantor et al., 1993; Leone et al., 1993; Howlett et al., 1994; Hartsough et al., 1998, Lombardi et al., 2000). Inoltre, è stato dimostrato come l'iperespressione di nm23-H1 nel clone MDA-C100 di linea cellulare di tumore alla mammella aggressivo riduca il suo fenotipo metastatico sia "*in vitro*" sia "*in vivo*" (Hartsough et al., 2000, Mao et al., 2001, Tseng et al., 2001).

L'inventore ha dimostrato nel corso di uno studio precedente l'interazione tra h-PRUNE e nm23-H1 e la compromissione di questa interazione mediante mutazione nm23H1-S120G (Reymond et al., 1999). Inoltre è stato dimostrato che l'amplificazione di numerose copie di h-PRUNE comporta l'induzione della proliferazione cellulare e che



Attraverso lo studio condotto dall'autore della presente invenzione è stato inoltre trovato che l'enzima h-PRUNE risulta essere iperespresso in concomitanza con una diminuzione dell'espressione di nm-23 nei tumori metastatici a livello di differenti tessuti. Inoltre, è stata trovata una correlazione diretta tra un'attività aumentata di h-PRUNE cAMP-PDE e la motilità cellulare, dovuta a un'interazione fisica proteina-proteina con nm23H1, in un modello di tumore alla mammella. Questa scoperta evidenzia l'interazione tra h-PRUNE e nm23-H1 che altera la funzione protettiva di nm23-H1 nella proliferazione cellulare e di soppressione dei processi di metastasi tumorale.

Secondo un ulteriore aspetto dell'invenzione è stato valutato il possibile ruolo di h-PRUNE come potenziale marker indipendente per la prognosi del decorso clinico del cancro alla mammella studiando la distribuzione dell'espressione della proteina h-PRUNE e di nm23-H1 in un gruppo di pazienti con il carcinoma alla mammella. In particolare, l'iperespressione di h-PRUNE, distribuita in modo omogeneo tra i vari casi clinici analizzati, offre la possibilità di un vantaggioso impiego della proteina come marker di prognosi indipendente da altri fattori quali, ad esempio, il tipo di tumore, le dimensioni istologiche, la reattività dei recettori degli estrogeni e del progesterone, il coinvolgimento dei linfonodi. L'identificazione di un nuovo marker è utile per individuare i tumori con potenziale metastatico e per rendere più efficace la gestione dei pazienti affetti da cancro alla mammella, in termini di scelta di terapia mirata da adottare.

Tra gli inibitori delle fosfodiesterasi (PDE) che sono stati testati mediante un metodo di screening adatto per la valutazione dell'inibizione dell'attività fosfodiesterasica nucleotide ciclica di h-PRUNE, il dipiridamolo, un farmaco già noto per le sue caratteristiche di anticoagulante, ha mostrato la più alta capacità di inibire in termini  $IC_{50}$  l'attività di h-PRUNE, sia *in vitro* sia nel modello cellulare di mammella. Anche la vinpocetina e la 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX) nel corso dello screening hanno mostrato valori di  $IC_{50}$  promettenti per l'inibizione di h-PRUNE; i dati risultanti da questa selezione suggeriscono di indirizzare lo screening agli analoghi strutturali, ai derivati e agli isomeri dei tre composti sopra menzionati.



- a) scelta di almeno un composto inibitore delle fosfoesterasi (PDE) o un suo derivato, analogo strutturale o isomero;
- b) somministrazione di detto almeno un composto ad una concentrazione compresa tra 0,05  $\mu\text{M}$  e 10  $\mu\text{M}$  ad una linea cellulare iperesprimente h-PRUNE;
- c) analisi quantitativa dell'attività fosfodiesterasica nucleotide ciclica di h-PRUNE e/o analisi della motilità cellulare in funzione della concentrazione di detto almeno un composto.

L'inibizione dell'attività fosfodiesterasica nucleotide ciclica di h-PRUNE da parte di un composto testato come inibitore di detta attività può essere stabilita valutando la  $IC_{50}$  del suddetto composto.

Esempi di linee cellulari che iperesprimono h-PRUNE sono i seguenti: MDA-C100, MDA-prune, MDA-prune $\Delta$ , MDA-prune4D $\Delta$ , MDA-PDE5A, MDA-H1-177, MDA-nm23H1-S120G, MDA-nm23H1-S120G-prune, MDA-nm23H1-P96S, MDA-nm23H1-P96S-prune.

L'analisi quantitativa dell'attività fosfodiesterasica nucleotide ciclica di h-PRUNE può essere condotta mediante test di idrolisi del substrato c-AMP e/o c-GMP. Detto substrato è utilizzato in concentrazioni comprese tra 0,008  $\mu$ M e 1  $\mu$ M.

Costituisce ulteriore oggetto della presente invenzione un metodo per la preparazione di una composizione farmaceutica comprendente il metodo come sopra descritto che comprende ulteriormente la fase d) di miscelazione di almeno un composto identificato, o un suo derivato, un suo analogo strutturale, o un suo isomero, assieme ad uno o più coadiuvanti e/o eccipienti farmacologicamente accettabili.

La presente invenzione concerne ulteriormente l'uso di composti inibitori di h-PRUNE selezionati secondo il metodo definito sopra, per la preparazione di un medicamento per la prevenzione ed il trattamento delle metastasi dei tumori caratterizzati da una iperespressione di h-PRUNE, dove detti tumori possono essere il carcinoma alla mammella, il sarcoma, il neuroblastoma ed il melanoma.

Ulteriore oggetto della presente invenzione è un metodo per la

rivelazione di h-PRUNE in un campione biologico per la diagnosi delle metastasi dei tumori caratterizzati da un'iperespressione di h-PRUNE mediante saggio immunologico, analisi FISH, PCR Real-time, ibridazione *in situ*. In particolare, detto metodo può comprendere le seguenti fasi:

- a) mettere in contatto detto campione biologico quale, ad esempio, una sezione di tessuto o un fluido biologico, con almeno un anticorpo anti-h-PRUNE, monoclonale o policlonale, che può essere marcato con un radioisotopo, una molecola fluorescente o un enzima;
- b) rivelazione del complesso antigene-anticorpo;
- c) analisi quantitativa del complesso antigene-anticorpo.

La rivelazione e l'analisi quantitativa del complesso antigene-anticorpo possono essere effettuate mediante analisi immunoistochimica, immunoprecipitazione immunofluorescenza, ELISA, immunoblotting.

Per quanto concerne il metodo per la rivelazione di h-PRUNE in un campione biologico per la diagnosi delle metastasi dei tumori caratterizzati da una iperespressione di h-PRUNE mediante PCR Real-time, i primer specifici sono:

5'-AGAGATCTTGGACAGGCAAAC-3';

3'-CCATGTTGACACAGTCCAGGAT-5';

o le sequenze ad esse complementari.

Relativamente al metodo per la rivelazione di h-PRUNE in un campione biologico per la diagnosi delle metastasi dei tumori caratterizzati da una iperespressione di h-PRUNE mediante ibridazione

*in situ* la sonda marcata può comprendere la sequenza oligonucleotidica:

CTGCATGGAACCATC

o la sequenza ad essa complementare o la sequenza in cui T è sostituita da U.

Detta sonda marcata per PCR Real-time può essere lineare o circolare (TaqMan, Hybridization probe, Molecular Beacon) e la marcatura può essere con almeno un radioisotopo e/o un fluorocromo. La marcatura con almeno un fluorocromo (di emissione o di eccitazione), preferibilmente con 6FAM (6-carbossifluoresceina) può essere effettuata all'estremità 3' e/o 5' della sequenza oligonucleotidica della sonda.

Costituisce ulteriore oggetto della presente invenzione un kit diagnostico per la rivelazione di h-PRUNE in un campione biologico per la diagnosi delle metastasi dei tumori caratterizzati da una iperespressione di h-PRUNE (quali, ad esempio, il carcinoma alla mammella, il sarcoma, il neuroblastoma, il melanoma) comprendente almeno un anticorpo anti-h-PRUNE, monoclonale o policlonale, che può essere marcato, ad esempio, con un radioisotopo, una molecola fluorescente o un enzima.

Il kit diagnostico può alternativamente comprendere una coppia di primer specifici per h-PRUNE che può comprendere le sequenze:

5'-AGAGATCTTGGACAGGCAAAC-3';

3'-CCATGTTGACACAGTCCAGGAT-5';

o sequenze ad esse complementari.

Infine il kit diagnostico può comprendere almeno una sonda oligonucleotidica marcata per PCR Real-time o per l'ibridazione *in situ* che può comprendere la sequenza oligonucleotidica:

CTGCATGGAACCATC

o la sequenza ad essa complementare o la sequenza in cui T è sostituita da U.

Detta sonda oligonucleotidica marcata per PCR Real-time può essere lineare e/o circolare e la marcatura può essere con almeno un radioisotopo e/o un fluorocromo, preferibilmente con 6FAM (6-carbossifluoresceina) e può essere effettuata all'estremità 3' e/o 5' della sequenza oligonucleotidica della sonda.

Forma ulteriore oggetto della presente invenzione un anticorpo monoclonale murino in grado di riconoscere e legare in modo selettivo la proteina h-PRUNE ricombinante caratterizzato dal fatto di appartenere alla classe delle immunoglobuline IgM e di essere prodotto da un clone scelto dal gruppo che consiste in 4G3, 4G3/3, 4G3/4, 2C/3, 2C3/2, 2E10 e 3H6. Questi cloni sono stati ottenuti mediante l'immunizzazione dei topi con la proteina h-PRUNE ricombinante intera in un costrutto p-maltose.

Inoltre la presente invenzione concerne un anticorpo policlonale da coniglio per h-PRUNE (A59) caratterizzato dal fatto di riconoscere e legare in modo selettivo il peptide utilizzato per l'immunizzazione dei conigli comprendente la sequenza amminoacidica:

NH<sub>2</sub>-Ala-Leu-Glu-Glu-Ala-Val-Ala-Glu-Val-Leu-Asp-His-Arg-Pro-Ile-Glu-Pro-Lys-COOH o parti di essa.

ING. DANIELLO C. ZANARDI PAT. 1.464.949

Costituiscono ulteriore oggetto della presente invenzione i primer specifici per l'amplificazione mediante PCR Real-time di h-PRUNE comprendenti almeno una delle sequenze oligonucleotidiche:

5'-AGAGATCTTGGACAGGCAAAC-3';

3'-CCATGTTGACACAGTCCAGGAT-5';

o sequenze ad esse complementari.

Infine, la presente invenzione concerne una sonda oligonucleotidica specifica per h-PRUNE per PCR Real-time o per l'ibridazione *in situ* comprendente la sequenza:

CTGCATGGAACCATC

o la sequenza ad essa complementare o la sequenza in cui T è sostituita da U.

Detta sonda oligonucleotidica per PCR Real-time può essere lineare e/o circolare e può essere marcata con almeno un radioisotopo e/o un fluorocromo, preferibilmente con 6FAM (6-carbossifluoresceina) e detta marcatura può essere effettuata all'estremità 3' e/o 5' della sequenza oligonucleotidica della sonda.

La presente invenzione verrà ora descritta a titolo illustrativo, ma non limitativo, secondo sue forme preferite di realizzazione, con particolare riferimento alle figure dei disegni allegati, in cui:

la figura 1 mostra l'allineamento multiplo di sequenze della famiglia delle DHH fosfoesterasi, rivelando separatamente i 4 motivi generici (I-IV) e gli motivi diagnostici delle due distinte sottofamiglie che mappano sul secondo dominio; i numeri indicano la posizione del primo residuo allineato per ogni sequenza proteica e le distanze tra i



diversi elementi (pannello A). Struttura "ribbon" della proteina h-PRUNE basata sulla struttura cristallina di PPASE e la proteina RecJ (pannello B) e struttura "ribbon" della proteina RecJ (pannello C); le frecce indicano i residui di acido aspartico (D);

la figura 2 mostra l'identificazione dell'attività PDE di h-PRUNE sui substrati c-AMP e c-GMP (pannello A). Istogramma dell'analisi di mutazioni singole e multiple che mappano nel potenziale sito catalitico della proteina h-PRUNE (pannello B). Grafici Lineweaver-Burk per determinare  $K_m$  e  $V_{max}$  rispettivamente per i substrati c-AMP e c-GMP (pannelli C, D). Attività c-AMP-PDE misurata in presenza di due differenti tamponi a concentrazioni crescenti di  $Mg^{2+}$  (pannello E). Attività c-AMP-PDE misurata in presenza di due differenti tamponi a concentrazioni crescenti di  $Mg^{2+}$  (punti neri) o  $Mn^{2+}$  (punti bianchi). Sono rappresentate le curve rappresentanti le attività di h-PRUNE (linee uniformi) e di h-PRUNE $\Delta$  (linee tratteggiate) (pannello F);

la figura 3 mostra le analisi di cloni stabili e saggi di motilità *in vitro*. Analisi dell'espressione m-RNA mediante Real-time quantitativa dei geni h-PRUNE e nm23-H1, sono indicati i relativi valori  $\Delta Ct$  (pannello A). Rivelazione dell'espressione m-RNA mediante Real-Time, è riportato il valore del numero delle copie degli m-RNA (pannello B). Analisi Western Blot usando anticorpi specifici per h-PRUNE, nm23h1 e His-tag (per PDE5A) indicano le quantità delle proteine espressa in ciascun clone cellulare (pannello C). Motilità cellulare delle linee cellulari MDA C-100 (controllo), MDA H1-177, MDA-PRUNE e MDA-H1-177-PRUNE, iperesprimenti rispettivamente h-PRUNE da solo

(cloni #3 e #4) o h-PRUNE e nm23-H1 (cloni #7 e #8), (pannello D). Motilità cellulare delle linee cellulari MDA C-100 (controllo), MDA-PRUNE (cloni #3 e #4) e MDA-PRUNE $\Delta$  (cloni #10 e #11) MDA-PRUNE4D $\Delta$  (cloni #19 e #20), MDA-PDE5A (cloni #14 e #16) e MDA-H1-177 (pannello E). Motilità cellulare delle linee cellulari MDA C-100 (controllo), MDA-nm23H1-S120G, MDA-nm23H1-S120G-PRUNE (cloni #2 e #3) e MDA-nm23H1-P96S, MDA-nm23H1-P96S-PRUNE (cloni #4 e #5) iperesprimanti mutanti nm23H1 da soli o con h-PRUNE (pannello F);

la figura 4 mostra l'analisi dell'attività PDE di h-PRUNE *in vitro* e *in vivo*; attività di c-AMP-PDE di h-PRUNE e h-PRUNE $\Delta$  in presenza delle proteine nm23; (pannello A). Nel pannello B è riportata la tabella con i valori dell'attività di h-PRUNE-PDE misurati come  $\text{pmol} \times \text{min}^{-1} \times \mu\text{g}^{-1}$  sul totale di proteine contenuto nel lisato cellulare;

la figura 5 mostra l'istogramma di motilità che rappresenta l'analisi dell'attività inibitoria sulle PDE e sulla motilità delle linee cellulari MDA C-100 (controllo), MDA-PRUNE (cloni #3 e #4) e MDA-PRUNE $\Delta$  (cloni #10 e #11) (pannello A). Nel pannello B è riportata la tabella con le attività di inibizione su diverse PDE da parte di 8 inibitori testati espresse come valori di  $\text{IC}_{50}$ , nell'ultima colonna sono riportati i valori di  $\text{IC}_{50}$  per h-PRUNE per alcuni dei composti più sensibili.

la figura 6 mostra l'analisi *in vivo* delle metastasi associate a tumori al seno; analisi FISH su MTA (multiple tissue array) che mostra l'amplificazione di h-PRUNE (sinistra) e di nm23-H1 (destra) (pannello A). Ingrandimento 100X e 200X delle analisi immunoistochimiche (IHC)

di due gruppi di tumore con alta espressione (+++) di h-PRUNE (sinistra) paragonato ad un livello medio-basso (0/+) di espressione di nm23-H1 (destra) (pannelli B, C); tabella dei risultati delle analisi FISH e IHC condotte su 59 casi di cancro alla mammella TNM<sub>1</sub> (pannello D).

la figura 7 mostra un modello che rappresenta la funzione pro-metastatica di h-PRUNE nel cancro alla mammella;

la figura 8 mostra le analisi FISH e l'immunoistochimica comparative dei tessuti della mammella normali e tumorali; nel pannello A è rappresentata l'analisi FISH su MTA che consente di individuare il numero di copie di h-PRUNE sia nei tessuti normali sia nei tessuti tumorali (a sinistra) e nei tessuti tuorali ma non metastatici (a destra); nel pannello B è riportato un ingrandimento dell'analisi immunoistochimica condotta su due gruppi di tumori con bassa espressione (+) di h-PRUNE;

la figura 9 mostra l'espressione di h-PRUNE e l'analisi citogenetica nel carcinoma alla mammella. Nel pannello A è mostrata l'analisi immunoistochimica per l'espressione di h-PRUNE condotta su sezioni TMA e l'ingrandimento 40X di un'immunocolorazione di h-PRUNE positiva (a) e negativa (b). Nel pannello B è riportata l'analisi FISH sugli stessi campioni impiegando come sonde h-PRUNE/PAC279-h19 e pUC177 come controllo;

la figura 10 mostra l'analisi di sopravvivenza Kaplan-Meier sull'espressione di h-PRUNE ed nm23-H1. Tutti i casi di carcinoma alla mammella sono stati sottoposti ad immunocolorazione di nm23-H1 (A) e h-PRUNE (B); i carcinomi alla mammella h-PRUNE positivi in

1. 2. 3. 4. 5. 6. 7. 8. 9. 10. 11. 12. 13. 14. 15. 16. 17. 18. 19. 20. 21. 22. 23. 24. 25. 26. 27. 28. 29. 30. 31. 32. 33. 34. 35. 36. 37. 38. 39. 40. 41. 42. 43. 44. 45. 46. 47. 48. 49. 50. 51. 52. 53. 54. 55. 56. 57. 58. 59. 60. 61. 62. 63. 64. 65. 66. 67. 68. 69. 70. 71. 72. 73. 74. 75. 76. 77. 78. 79. 80. 81. 82. 83. 84. 85. 86. 87. 88. 89. 90. 91. 92. 93. 94. 95. 96. 97. 98. 99. 100. 101. 102. 103. 104. 105. 106. 107. 108. 109. 110. 111. 112. 113. 114. 115. 116. 117. 118. 119. 120. 121. 122. 123. 124. 125. 126. 127. 128. 129. 130. 131. 132. 133. 134. 135. 136. 137. 138. 139. 140. 141. 142. 143. 144. 145. 146. 147. 148. 149. 150. 151. 152. 153. 154. 155. 156. 157. 158. 159. 160. 161. 162. 163. 164. 165. 166. 167. 168. 169. 170. 171. 172. 173. 174. 175. 176. 177. 178. 179. 180. 181. 182. 183. 184. 185. 186. 187. 188. 189. 190. 191. 192. 193. 194. 195. 196. 197. 198. 199. 200. 201. 202. 203. 204. 205. 206. 207. 208. 209. 210. 211. 212. 213. 214. 215. 216. 217. 218. 219. 220. 221. 222. 223. 224. 225. 226. 227. 228. 229. 230. 231. 232. 233. 234. 235. 236. 237. 238. 239. 240. 241. 242. 243. 244. 245. 246. 247. 248. 249. 250. 251. 252. 253. 254. 255. 256. 257. 258. 259. 260. 261. 262. 263. 264. 265. 266. 267. 268. 269. 270. 271. 272. 273. 274. 275. 276. 277. 278. 279. 280. 281. 282. 283. 284. 285. 286. 287. 288. 289. 290. 291. 292. 293. 294. 295. 296. 297. 298. 299. 300. 301. 302. 303. 304. 305. 306. 307. 308. 309. 310. 311. 312. 313. 314. 315. 316. 317. 318. 319. 320. 321. 322. 323. 324. 325. 326. 327. 328. 329. 330. 331. 332. 333. 334. 335. 336. 337. 338. 339. 340. 341. 342. 343. 344. 345. 346. 347. 348. 349. 350. 351. 352. 353. 354. 355. 356. 357. 358. 359. 360. 361. 362. 363. 364. 365. 366. 367. 368. 369. 370. 371. 372. 373. 374. 375. 376. 377. 378. 379. 380. 381. 382. 383. 384. 385. 386. 387. 388. 389. 390. 391. 392. 393. 394. 395. 396. 397. 398. 399. 400. 401. 402. 403. 404. 405. 406. 407. 408. 409. 410. 411. 412. 413. 414. 415. 416. 417. 418. 419. 420. 421. 422. 423. 424. 425. 426. 427. 428. 429. 430. 431. 432. 433. 434. 435. 436. 437. 438. 439. 440. 441. 442. 443. 444. 445. 446. 447. 448. 449. 450. 451. 452. 453. 454. 455. 456. 457. 458. 459. 460. 461. 462. 463. 464. 465. 466. 467. 468. 469. 470. 471. 472. 473. 474. 475. 476. 477. 478. 479. 480. 481. 482. 483. 484. 485. 486. 487. 488. 489. 490. 491. 492. 493. 494. 495. 496. 497. 498. 499. 500. 501. 502. 503. 504. 505. 506. 507. 508. 509. 510. 511. 512. 513. 514. 515. 516. 517. 518. 519. 520. 521. 522. 523. 524. 525. 526. 527. 528. 529. 530. 531. 532. 533. 534. 535. 536. 537. 538. 539. 540. 541. 542. 543. 544. 545. 546. 547. 548. 549. 550. 551. 552. 553. 554. 555. 556. 557. 558. 559. 560. 561. 562. 563. 564. 565. 566. 567. 568. 569. 570. 571. 572. 573. 574. 575. 576. 577. 578. 579. 580. 581. 582. 583. 584. 585. 586. 587. 588. 589. 590. 591. 592. 593. 594. 595. 596. 597. 598. 599. 600. 601. 602. 603. 604. 605. 606. 607. 608. 609. 610. 611. 612. 613. 614. 615. 616. 617. 618. 619. 620. 621. 622. 623. 624. 625. 626. 627. 628. 629. 630. 631. 632. 633. 634. 635. 636. 637. 638. 639. 640. 641. 642. 643. 644. 645. 646. 647. 648. 649. 650. 651. 652. 653. 654. 655. 656. 657. 658. 659. 660. 661. 662. 663. 664. 665. 666. 667. 668. 669. 670. 671. 672. 673. 674. 675. 676. 677. 678. 679. 680. 681. 682. 683. 684. 685. 686. 687. 688. 689. 690. 691. 692. 693. 694. 695. 696. 697. 698. 699. 700. 701. 702. 703. 704. 705. 706. 707. 708. 709. 710. 711. 712. 713. 714. 715. 716. 717. 718. 719. 720. 721. 722. 723. 724. 725. 726. 727. 728. 729. 730. 731. 732. 733. 734. 735. 736. 737. 738. 739. 740. 741. 742. 743. 744. 745. 746. 747. 748. 749. 750. 751. 752. 753. 754. 755. 756. 757. 758. 759. 760. 761. 762. 763. 764. 765. 766. 767. 768. 769. 770. 771. 772. 773. 774. 775. 776. 777. 778. 779. 780. 781. 782. 783. 784. 785. 786. 787. 788. 789. 790. 791. 792. 793. 794. 795. 796. 797. 798. 799. 800. 801. 802. 803. 804. 805. 806. 807. 808. 809. 810. 811. 812. 813. 814. 815. 816. 817. 818. 819. 820. 821. 822. 823. 824. 825. 826. 827. 828. 829. 830. 831. 832. 833. 834. 835. 836. 837. 838. 839. 840. 841. 842. 843. 844. 845. 846. 847. 848. 849. 850. 851. 852. 853. 854. 855. 856. 857. 858. 859. 860. 861. 862. 863. 864. 865. 866. 867. 868. 869. 870. 871. 872. 873. 874. 875. 876. 877. 878. 879. 880. 881. 882. 883. 884. 885. 886. 887. 888. 889. 890. 891. 892. 893. 894. 895. 896. 897. 898. 899. 900. 901. 902. 903. 904. 905. 906. 907. 908. 909. 910. 911. 912. 913. 914. 915. 916. 917. 918. 919. 920. 921. 922. 923. 924. 925. 926. 927. 928. 929. 930. 931. 932. 933. 934. 935. 936. 937. 938. 939. 940. 941. 942. 943. 944. 945. 946. 947. 948. 949. 950. 951. 952. 953. 954. 955. 956. 957. 958. 959. 960. 961. 962. 963. 964. 965. 966. 967. 968. 969. 970. 971. 972. 973. 974. 975. 976. 977. 978. 979. 980. 981. 982. 983. 984. 985. 986. 987. 988. 989. 990. 991. 992. 993. 994. 995. 996. 997. 998. 999. 1000. 1001. 1002. 1003. 1004. 1005. 1006. 1007. 1008. 1009. 1010. 1011. 1012. 1013. 1014. 1015. 1016. 1017. 1018. 1019. 1020. 1021. 1022. 1023. 1024. 1025. 1026. 1027. 1028. 1029. 1030. 1031. 1032. 1033. 1034. 1035. 1036. 1037. 1038. 1039. 1040. 1041. 1042. 1043. 1044. 1045. 1046. 1047. 1048. 1049. 1050. 1051. 1052. 1053. 1054. 1055. 1056. 1057. 1058. 1059. 1060. 1061. 1062. 1063. 1064. 1065. 1066. 1067. 1068. 1069. 1070. 1071. 1072. 1073. 1074. 1075. 1076. 1077. 1078. 1079. 1080. 1081. 1082. 1083. 1084. 1085. 1086. 1087. 1088. 1089. 1090. 1091. 1092. 1093. 1094. 1095. 1096. 1097. 1098. 1099. 1100. 1101. 1102. 1103. 1104. 1105. 1106. 1107. 1108. 1109. 1110. 1111. 1112. 1113. 1114. 1115. 1116. 1117. 1118. 1119. 1120. 1121. 1122. 1123. 1124. 1125. 1126. 1127. 1128. 1129. 1130. 1131. 1132. 1133. 1134. 1135. 1136. 1137. 1138. 1139. 1140. 1141. 1142. 1143. 1144. 1145. 1146. 1147. 1148. 1149. 1150. 1151. 1152. 1153. 1154. 1155. 1156. 1157. 1158. 1159. 1160. 1161. 1162. 1163. 1164. 1165. 1166. 1167. 1168. 1169. 1170. 1171. 1172. 1173. 1174. 1175. 1176. 1177. 1178. 1179. 1180. 1181. 1182. 1183. 1184. 1185. 1186. 1187. 1188. 1189. 1190. 1191. 1192. 1193. 1194. 1195. 1196. 1197. 1198. 1199. 1200. 1201. 1202. 1203. 1204. 1205. 1206. 1207. 1208. 1209. 1210. 1211. 1212. 1213. 1214. 1215. 1216. 1217. 1218. 1219. 1220. 1221. 1222. 1223. 1224. 1225. 1226. 1227. 1228. 1229. 1230. 1231. 1232. 1233. 1234. 1235. 1236. 1237. 1238. 1239. 1240. 1241. 1242. 1243. 1244. 1245. 1246. 1247. 1248. 1249. 1250. 1251. 1252. 1253. 1254. 1255. 1256. 1257. 1258. 1259. 1260. 1261. 1262. 1263. 1264. 1265. 1266. 1267. 1268. 1269. 1270. 1271. 1272. 1273. 1274. 1275. 1276. 1277. 1278. 1279. 1280. 1281. 1282. 1283. 1284. 1285. 1286. 1287. 1288. 1289. 1290. 1291. 1292. 1293. 1294. 1295. 1296. 1297. 1298. 1299. 1300. 1301. 1302. 1303. 1304. 1305. 1306. 1307. 1308. 1309. 1310. 1311. 1312. 1313. 1314. 1315. 1316. 1317. 1318. 1319. 1320. 1321. 1322. 1323. 1324. 1325. 1326. 1327. 1328. 1329. 1330. 1331. 1332. 1333. 1334. 1335. 1336. 1337. 1338. 1339. 1340. 1341. 1342. 1343. 1344. 1345. 1346. 1347. 1348. 1349. 1350. 1351. 1352. 1353. 1354. 1355. 1356. 1357. 1358. 1359. 1360. 1361. 1362. 1363. 1364. 1365. 1366. 1367. 1368. 1369. 1370. 1371. 1372. 1373. 1374. 1375. 1376. 1377. 1378. 1379. 1380. 1381. 1382. 1383. 1384. 1385. 1386. 1387. 1388. 1389. 1390. 1391. 1392. 1393. 1394. 1395. 1396. 1397. 1398. 1399. 1400. 1401. 1402. 1403. 1404. 1405. 1406. 1407. 1408. 1409. 1410. 1411. 1412. 1413. 1414. 1415. 1416. 1417. 1418. 1419. 1420. 1421. 1422. 1423. 1424. 1425. 1426. 1427. 1428. 1429. 1430. 1431. 1432. 1433. 1434. 1435. 1436. 1437. 1438. 1439. 1440. 1441. 1442. 1443. 1444. 1445. 1446. 1447. 1448. 1449. 1450. 1451. 1452. 1453. 1454. 1455. 1456. 1457. 1458. 1459. 1460. 1461. 1462. 1463. 1464. 1465. 1466. 1467. 1468. 1469. 1470. 1471. 1472. 1473. 1474. 1475. 1476. 1477. 1478. 1479. 1480. 1481. 1482. 1483. 1484. 1485. 1486. 1487. 1488. 1489. 1490. 1491. 1492. 1493. 1494. 1495. 1496. 1497. 1498. 1499. 1500. 1501. 1502. 1503. 1504. 1505. 1506. 1507. 1508. 1509. 1510. 1511. 1512. 1513. 1514. 1515. 1516. 1517. 1518. 1519. 1520. 1521. 1522. 1523. 1524. 1525. 1526. 1527. 1528. 1529. 1530. 1531. 1532. 1533. 1534. 1535. 1536. 1537. 1538. 1539. 1540. 1541. 1542. 1543. 1544. 1545. 1546. 1547. 1548. 1549. 1550. 1551. 1552. 1553. 1554. 1555. 1556. 1557. 1558. 1559. 1560. 1561. 1562. 1563. 1564. 1565. 1566. 1567. 1568. 1569. 1570. 1571. 1572. 1573. 1574. 1575. 1576. 1577. 1578. 1579. 1580. 1581. 1582. 1583. 1584. 1585. 1586. 1587. 1588. 1589. 1590. 1591. 1592. 1593. 1594. 1595. 1596. 1597. 1598. 1599. 1600. 1601. 1602. 1603. 1604. 1605. 1606. 1607. 1608. 1609. 1610. 1611. 1612. 1613. 1614. 1615. 1616. 1617. 1618. 1619. 1620. 1621. 1622. 1623. 1624. 1625. 1626. 1627. 1628. 1629. 1630. 1631. 1632. 1633. 1634. 1635. 1636. 1637. 1638. 1639. 1640. 1641. 1642. 1643. 1644. 1645. 1646. 1647. 1648. 1649. 1650. 1651. 1652. 1653. 1654. 1655. 1656. 1657. 1658. 1659. 1660. 1661. 1662. 1663. 1664. 1665. 1666. 1667. 1668. 1669. 1670. 1671. 1672. 1673. 1674. 1675. 1676. 1677. 1678. 1679. 1680. 1681. 1682. 1683. 1684. 1685. 1686. 1687. 1688. 1689. 1690. 1691. 1692. 1693. 1694. 1695. 1696. 1697. 1698. 1699. 1700. 1701. 1702. 1703. 1704. 1705. 1706. 1707. 1708. 1709. 1710. 1711. 1712. 1713. 1714. 1715. 1716. 1717. 1718. 1719. 1720. 1721. 1722. 1723. 1724. 1725. 1726. 1727. 1728. 1729. 1730. 1731. 1732. 1733. 1734. 1735. 1736. 1737. 1738. 1739. 1740. 1741. 1742. 1743. 1744. 1745. 1746. 1747. 1748. 1749. 1750. 1751. 1752. 1753. 1754. 1755. 1756. 1757. 1758. 1759. 1760. 1761. 1762. 1763. 1764. 1765. 1766. 1767. 1768. 1769. 1770. 1771. 1772. 1773. 1774. 1775. 1776. 1777. 1778. 1779. 1780. 1781. 1782. 1783. 1784. 1785. 1786. 1787. 1788. 1789. 1790. 1791. 1792. 1793. 1794. 1795. 1796. 1797. 1798. 1799. 1800. 1801. 1802. 1803. 1804. 1805. 1806. 1807. 1808. 1809. 1810. 1811. 1812. 1813. 1814. 1815. 1816. 1817. 1818. 1819. 1820. 1821. 1822. 1823. 1824. 1825. 1826. 1827. 1828. 1829. 1830. 1831. 1832. 1833. 1834. 1835. 1836. 1837. 1838. 1839. 1840. 1841. 1842. 1843. 1844. 1845. 1846. 1847. 1848. 1849. 1850. 1851. 1852. 1853. 1854. 1855. 1856. 1857. 1858. 1859. 1860. 1861. 1862. 1863. 1864. 1865. 1866. 1867. 1868. 1869. 1870. 1871. 1872. 1873. 1874. 1875. 1876. 1877. 1878. 1879. 1880. 1881. 1882. 1883. 1884. 1885. 1886. 1887. 1888. 1889. 1890. 1891. 1892. 1893. 1894. 1895. 1896. 1897. 1898. 1899. 1900. 1901. 1902. 1903. 1904. 1905. 1906. 1907. 1908. 1909. 1910. 1911. 1912. 1913. 1914. 1915. 1916. 1917. 1918. 1919. 1920. 1921. 1922. 1923. 1924. 1925. 1926. 1927. 1928. 1929. 1930. 1931. 1932. 1933. 1934. 1935. 1936. 1937. 1938. 1939. 1940. 1941. 1942. 1943. 1944. 1945. 1946. 1947. 1948. 1949. 1950. 1951. 1952. 1953. 1954. 1955. 1956. 1957. 1958. 1959. 1960. 1961. 1962. 1963. 1964. 1965. 1966. 1967. 1968. 1969. 1970. 1971. 1972. 1973. 1974. 1975. 1976. 1977. 1978. 1979. 1980. 1981. 1982. 1983. 1984. 1985. 1986. 1987. 1988. 1989. 1990. 1991. 1992. 1993. 1994. 1995. 1996. 1997. 1998. 1999. 2000. 2001. 2002. 2003. 2004. 2005. 2006. 2007. 2008. 2009. 2010. 2011. 2012. 2013. 2014. 2015. 2016. 2017. 2018. 2019. 2020. 2021. 2022. 2023. 2024. 2025. 2026. 2027. 2028. 2029. 2030. 2031. 2032. 2033. 2034. 2035. 2036. 2037. 2038. 2039. 2040. 2041. 2042. 2043. 2044. 2045. 2046. 2047. 2048. 2049. 2050. 2051. 2052. 2053. 2054. 2055. 2056. 2057. 2058. 2059. 2060. 2061. 2062. 2063. 2064. 2065. 2066. 2067. 2068. 2069. 2070. 2071. 2072. 2073. 2074. 2075. 2076. 2077. 2078. 2079. 2080. 2081. 2082. 2083. 2084. 2085. 2086. 2087. 2088. 2089. 2090. 2091. 2092. 2093. 2094. 2095. 2096. 2097. 2098. 2099. 2100. 2101. 2102. 2103. 2104. 2105. 2106. 2107. 2108. 2109. 2110. 2111. 2112. 2113. 2114. 2115. 2116. 2117. 2118. 2119. 2120. 2121. 2122. 2123. 2124. 2125. 2126. 2127. 2128. 2129. 2130. 2131. 2132. 2133. 2134. 2135. 2136.

presenza (C) o in assenza (D) di coinvolgimento dei linfonodi ascellari.

#### ESEMPIO 1: Analisi strutturale e funzionale di h-PRUNE

##### MATERIALI E METODI

##### Analisi della sequenza proteica

Il database di sequenze proteiche non ridondante al National Center for Biotechnology (NIH, Bethesda) è stato consultato in modo iterativo utilizzando il programma PSI-BLAST (Altschul et al., 1997). Gli allineamenti multipli di sequenze proteiche sono stati allestiti il programma T\_coffee (Notredame et al., 1993) e corretti sulla base dei risultati ottenuti con il programma PSI-BLAST.

Gli alberi filogenetici sono stati costruiti utilizzando il programma Fitch della Philip ed il programma ProtML del pacchetto Molphy.

La costruzione dei modelli di omologia delle strutture proteiche è stata effettuata impiegando il software di visione SWISS-PDB e l'allineamento con il template è stato manualmente aggiustato per minimizzare i contrasti dello scheletro della proteina. La minimizzazione dell'energia è stata condotta utilizzando il programma GROMOS che impiega un campo Sippl-like.

I diagrammi delle strutture delle proteine a nastro (ribbon) sono stati generati utilizzando il programma MOLSCRIPT.

##### Coltura cellulare

Le cellule HEK-293 e MDA-MB-435 sono state coltivate in terreno Dulbecco modificato Eagle e addizionato con il 10% Unità/ml di penicillina e 100 µg/ml di streptomicina a 37°C con 5% CO<sub>2</sub>.

##### Espressione proteica e la purificazione in *Baculovirus*

L'espressione proteica è stata effettuata usando come sistema di espressione *Baculovirus* (Invitrogen). In breve, il c-DNA codificante per h-PRUNE, nm23-H1 e i mutanti nm23-H1 (Mac Donald et al., 1996) e h-PRUNE: h-PRUNE $\Delta$ , D28A, D106A, D179A, D28A-D106A, D28A-D106A-D126A, D28A- $\Delta$ , 4D $\Delta$  (D28A-D106A- $\Delta$ -D179A) sono stati subclonati in un vettore pFastBac-Hta digerito con EcoRI/XhoI.

Al fine di produrre i c-DNA dei mutanti h-PRUNE, è stata condotta una mutagenesi sito diretta del costrutto di h-PRUNE utilizzando il kit QuikChange III (Stratagene) in accordo alle istruzioni del produttore (vedi esempio 2).

L'infezione virale e le condizioni di purificazione sono state descritte in Garzia e coll. (2003).

Successivamente sono state purificate h-PRUNE e h-PRUNE $\Delta$  provviste di code di istidina su una colonna MonoQ HR 5/5 (Amersham) impiegando 10 mM Tris HCl in tampone a pH 8,0. L'eluizione dalla colonna è stata effettuata su un gradiente lineare da 0 a 0,8 M NaCl, per 20 minuti e ad una velocità di flusso di 1ml/minuto. Le frazioni sono state successivamente dializzate contro 10 mM Tris HCl, tampone pH 8 e testate per l'attività.

La purezza delle proteine isolate è stata valutata mediante analisi elettroforetica SDS-PAGE.

#### Identificazione e caratterizzazione dell'attività fosfodiesterasica di h-PRUNE

L'attività PDE è stata misurata mediante saggio di rivelazione cAMP/cGMP, come descritto da Fischer et al., 1998 e con saggio di

scintillazione (Amersham-Pharmacia Biotech).

I campioni sono stati diluiti ed incubati a 30°C in 100 µl di tampone per il saggio (50 mM Tris-HCl, pH 7,4, 8,3 mM MgCl<sub>2</sub>, 1,7 mM EGTA) contenente la concentrazione desiderata di cAMP o cGMP come substrati (rapporto 3:1 non marcato/ <sup>3</sup>H marcato).

Tutte le reazioni, ivi incluse le reazioni dei bianchi contenenti solo il terreno, sono state condotte in triplicato e lasciate procedere per un tempo di incubazione tale da ottenere < 25 % di conversione del substrato (determinato empiricamente).

Le reazioni sono state terminate aggiungendo 50 µl di palline di silicato di Yttrium silicato SPA (Amersham).

Le attività enzimatiche sono state calcolate per la quantità di prodotto radiomarcato rivelato secondo le istruzioni del protocollo del produttore. Come controlli negativi è stata usata h-PRUNE pre-incubata con anticorpi policlonali A59, contro la regione del motivo III (Apotech Corporation, CH) e il mutante h-PRUNE Δ.

In particolare, per l'attività PDE di h-PRUNE e dei mutanti h-PRUNE sono stati incubati 200 ng di enzimi purificati sono stati incubati per 10 minuti a 30°C.

I grafici Lineweaver-Burk con i valori di  $K_m$  e di  $V_{max}$  sono stati determinati misurando l'idrolisi in un intervallo di concentrazioni di substrato (0,05-10,0 µM) ed una quantità fissa di enzima diluito dopo un tempo di corsa di 5-40 minuti. Le velocità iniziali sono state calcolate rispetto ogni concentrazione di substrato e tracciate in grafico rispetto alla concentrazione di substrato, dalla quale sono stati

determinati i parametri cinetici.

Per studiare l'influenza dei differenti tamponi e dell'attività di nm23 sull'attività PDE di h-PRUNE e per effettuare studi di inibizione è stato modificato il saggio PDE come riportato nella sezione materiali e metodi dell'esempio 2.

#### Saggi di motilità cellulare *in vitro*

I cloni MDA stabili iperesprimenti h-PRUNE, h-PRUNE $\Delta$ , h-PRUNE4D $\Delta$  e PDE5A umani sono stati prodotti ed analizzati come descritto nella sezione materiali e metodi dell'esempio 2.

La linea cellulare di controllo di cancro alla mammella MDA-C100 è stata impiegata nel saggio di motilità cellulare come descritto precedentemente (Leone et al., 1993) insieme alla linea cellulare iperesprimente nm23-H1 (MDA-H1-177), che mostra una inibizione dei processi di metastasi *in vivo*.

La motilità cellulare è stata determinata utilizzando la tecnologia trans-well a 6 pozzetti (Corning-Costar) utilizzando le concentrazioni finali pari a 0,25 %, 0,5 % FCS, 2,5 e 5 ng/ml di fibronectina (Sigma) come chemioattrattori (per ulteriori dettagli si rimanda alla sezione materiali e metodi dell'esempio 2).

#### Analisi statistica

Tutti i saggi, ivi inclusi quelli dell'attività PDE e della motilità cellulare, sono stati validati utilizzando il metodo T-test disponibile all'indirizzo <http://www.graphpad.com/quickcalcs/index.cfm>.

Per le analisi FISH e IHC e la collezione di casi clinici di tumori e selezione TNM sono riportate nella sezione materiali e metodi dell'

esempio 2.

## RISULTATI

### Analisi strutturale e funzionale di h-PRUNE

Una ricerca su un data base di proteina interattiva (PSI-BLAST) condotta sulla proteina h-PRUNE, ha consentito di raccogliere in modo statisticamente significativo, gli ortologi eucariotici di PRUNE, seguiti da pirofosfatasi inorganici da diverse varietà di batteri e proteine della famiglia DHH da vari organismi, ivi incluse le nucleasi di RecJ (figura 1 pannello C).

L'analisi del cluster delle proteine DHH individuato usando il programma BLASTCLUST e l'analisi filogenetica, applicando il metodo della massima probabilità, mostrano che le proteine PRUNE (umane e di Drosophila) appartengono alla seconda famiglia di DHH, insieme alle pirofosfatasi inorganiche (figura 1, pannello A).

Mentre le due famiglie di proteine DHH sono accomunate da un dominio N-terminale che contiene i quattro elementi conservati tipici della superfamiglia DHH, detti elementi sono distinti da ciascun altro dai loro domini C-terminali. Il dominio N-terminale in comune ha una struttura  $\alpha/\beta$  con foglietti  $\beta$  paralleli e contiene gli elementi assolutamente conservati nella forma DXD (modulo 1), D (modulo II), DHH (modulo III) e D/E (modulo IV) (figura 1, pannelli A e B).

Questi residui sono tutti sulla stessa faccia di questo dominio e insieme formano il sito catalitico che chela almeno due cationi bivalenti. Le proteine di PRUNE contengono la forma DHR come sostituzione



della DHH canonica (modulo –III) la cui presenza è stata osservata in tutti gli altri membri di questa famiglia (figura 1, pannello A).

In entrambe le famiglie DHH, il dominio C-terminale contiene un core con struttura a foglietto a cinque filamenti, quattro dei quali formano due strutture a forcina  $\beta$  a doppio filamento. Tuttavia, le differenze nei domini C-terminali tra le due famiglie delle proteine DHH possono contribuire in modo predominante nell'attribuire la specificità del substrato rispettive. Inoltre, il dominio C-terminale del modulo DHH di PRUNE di mammifero contiene una zona non-globulare entro la quale ci sono delle serine conservate che possono avere il ruolo di regolazione della fosforilazione.

L'analisi strutturale di h-PRUNE ha mostrato similarità con RecJ (Yamagata et al., 2002) e le pirofosfatasi (Ahn et al., 2001), ciò suggerisce una potenziale attività simile rispetto a quelle proteine.

Tuttavia, le loro forti interazioni sinergiche con le NDPK awd/K-pn-simili hanno suggerito che le proteine PRUNE possano avere substrati alternativi, come i nucleotidi.

Studi evoluzionistici sulla famiglia DHH hanno dimostrato che le fosfoesterasi sono derivate da un numero di ripiegamenti della proteina che contiene diverse domini fosfoesterasici e idrolasici. Questi includono: il ripiegamento HD, dal quale il segnale classico delle PDE viene riconosciuto (PDE1-11) (Aravind et al., 1998); il ripiegamento metallo- $\beta$ -lattamasi (Galperin et al., 1999, Aravind et al., 1999), dal quale i PDE PdsA-simili sono derivati e il ripiegamento fosfoesterasi

calcineurina-simile (Aravind et al., 1998), dal quale i PDE lcc-simili sono derivati.

Il dominio catalitico DHH ha un ripiegamento molto diverso da queste altre famiglie e contiene diversi residui analoghi chelanti i metalli (acido aspartico e istidine) che potrebbero potenzialmente definire una intera nuova classe di PDE. Allo scopo di testare questa ipotesi, h-PRUNE è stata espressa, purificata e saggiata per la sua potenziale attività di PDE.

#### Identificazione e caratterizzazione della attività PDE di h-PRUNE

Per determinare l'abilità di h-PRUNE a idrolizzare i legami fosfodiesterici nei nucleotidi ciclici (cAMP e cGMP), h-PRUNE è stata clonata ed espressa usando il sistema di espressione Baculovirus. H-PRUNE con una coda di His ed h-PRUNE  $\Delta$ , una mutazione creata nella regione del modulo III (DHRP126-129AAAA) sono state purificate mediante cromatografia di affinità.

È stata usato un saggio PDE per caratterizzare l'attività catalitica di h-PRUNE purificata e per determinare il substrato specifico.

Come mostrato nella figura 2, pannello A, h-PRUNE possiede attività PDE significativa che è più alta per il substrato c-AMP rispetto al c-GMP, mentre h-PRUNE $\Delta$  mostra un 40% di riduzione di questa attività. Come controllo positivo è stata usata PDE2; i controlli negativi sono stati sia h-PRUNE pre-incubata con anticorpo policlonale specifico A 59 e sia h-PRUNE $\Delta$ .

Per confermare l'attività di PDE trovata, h-PRUNE e h-PRUNE  $\Delta$  sono state iperespresse in modo transiente in cellule HEK-293 umane

e successivamente sottoposte ad immunoprecipitazione e ad un saggio PDE sulle proteine immunoprecipitate.

Questi risultati indicano che la proteina h-PRUNE, purificata sia da insetti sia da cellule umane, mostra attività PDE.

Per identificare gli amminoacidi potenzialmente coinvolti all'interno del sito catalitico, è stata condotta una analisi di mutazioni singole e multiple sito specifiche che influenzano l'attività PDE di h-PRUNE. Tutti i residui di acido aspartico degli elementi caratteristici DHH (figura 1, pannello B) sono stati mutati da soli o in combinazione (figura 2, pannello B). I mutanti sono stati espressi usando il sistema di espressione Baculovirus e purificati per omogeneità (con una resa di 80% di purificazione).

Sono state testate le proteine per la loro attività cAMP-PDE ed è stato osservato una diminuzione dell'80% dell'attività mutante di h-PRUNE 4D $\Delta$  (D28A, D106A,  $\Delta$ , D179A). Riassumendo, è stato trovato che gli amminoacidi D28, D126, H127, R128, P129 e D179 sono essenziali per l'attività PDE di h-PRUNE, indicando in questo modo che molto probabilmente fanno parte del sito catalitico. Invece, la mutazione D106A nel modulo II non influenza l'attività PDE di h-PRUNE.

Per definire i valori di  $K_m$  la proteina h-PRUNE con la coda di His è stata purificata per omogeneità mediante un altro step di purificazione usando una cromatografia a scambio ionico (colonna Mono-Q) con un'alta resa di purificazione (90%). I valori di  $K_m$  e  $V_{max}$  sono stati determinati misurando l'idrolisi dei nucleotidi con una

quantità fissa di enzima purificato in un intervallo di concentrazioni del substrato (0,05-10,0  $\mu\text{M}$ ) e considerando i dati nella parte lineare della reazione. Sia il cAMP sia il cGMP sono substrati per h-PRUNE, e mostrano valori di  $K_m$  di  $0,9 \pm 0,03 \mu\text{M}$  e  $2,3 \pm 0,11 \mu\text{M}$ , rispettivamente (figura 2, pannelli C e D).

Le velocità massime di conversione del substrato ( $V_{max}$ ) sono state trovate essere pari a  $12,8 \pm 0,5 \text{ pmol} \times \text{min}^{-1} \times \mu\text{g}^{-1}$  e  $16,1 \pm 0,8 \text{ pmol} \times \text{min}^{-1} \times \mu\text{g}^{-1}$  enzima purificato per cAMP e cGMP, rispettivamente.

Quindi, sono state presentate evidenze di una attività fosfodiesterasica nucleotide ciclica a carico di una proteina della superfamiglia DHH. Per studiare l'influenza del tampone sull'attività PDE di h-PRUNE, i tamponi Tris-HCl e HEPES sono stati testati in presenza dello stesso sale ed è stata osservata una attività più alta PDE in presenza del tampone Tris-HCl (figura 2, pannello E).

Considerando la dipendenza dalla presenza degli ioni delle proteine DHH, è stata valutata la dipendenza di h-PRUNE dalla presenza di ioni  $\text{Mg}^{2+}$  e  $\text{Mn}^{2+}$  nel saggio PDE cAMP. Sebbene sia stata trovata una più alta attività di h-PRUNE nel tampone Tris-HCl, i saggi PDE sono stati condotti in presenza del tampone HEPES per evitare le reazioni di ossido-riduzione e usando concentrazioni crescenti dei due differenti ioni bivalenti.

Sebbene un po' di attività PDE sia stata misurata nel tampone privi di ioni, la presenza di  $\text{Mg}^{2+}$  stimolava l'attività PDE di h-PRUNE (figura 2, pannello E); in contrasto, la presenza di  $\text{MnCl}_2$  inibiva questa attività. Inoltre, il mutante h-PRUNE $\Delta$  non è attivato dagli ioni  $\text{Mg}^{2+}$

come la proteina wild-type (figura 2, pannello F), indicando che il modulo III, modificato nel mutante h-PRUNE $\Delta$ , è necessario per l'attività fosfodiesterasica. In conclusione, è stato mostrato che l'attività cAMP-PDE di h-PRUNE viene influenzata positivamente dalla concentrazione di ioni Mg<sup>2+</sup>.

#### Cloni MDA stabili di h-PRUNE e correlazione con la motilità

Per studiare la funzione di h-PRUNE nel regolare le attività di anti-motilità di nm23-H1 e di soppressore di metastasi sono stati impiegati modelli cellulari di cancro alla mammella MDA-C100 e H1-177 (Hartsough et al., 2000, Mao et al., 2001, Tseng et al., 2001).

Sono stati prodotti diversi cloni stabili che iperesprimono il cDNA di h-PRUNE (clone# 3 e #4), il cDNA h-PRUNE $\Delta$  (clone #10 e #11), il cDNA h-PRUNE4D $\Delta$  (clone #19 e #20) e io cDNA PDE5A (clone #14 e #16) in cellule MDA-C100. Il cDNA di h-PRUNE in MDA-H1-177 iperesprime nm23-H1 (clone#7 e #8), in MDA sopra esprime nm23H1-P96S (clone #4 e #5) e in MDA sopra esprime nm23H1-S120G (clone #2 e #3) è stato stabilizzato.

Alcuni di questi cloni sono stati caratterizzati per determinare il livello di espressione di mRNA di h-PRUNE usando analisi di PCR Real Time mediante tecnologia TaqMan (figura 3, pannello A). Sono stati selezionati quattro cloni per i loro livelli di espressione di mRNA mediante analisi quantitativa ed estrapolazione di un numero di copie, da comparare al gene di riferimento target (GAPDH) (figura 3, pannello B).

Inoltre, le analisi Western Blot sono state condotte per identificare i livelli di espressione delle proteine h-PRUNE, nm23 e PDE5A (figura 3, pannello C).

I cloni stabili prodotti sono poi stati saggiati per la motilità cellulare usando camere per la coltura cellulare Trans well (Freije et al., 1997, Hartsough et al., 2001, Freije et al., 1997). Sono stati saggiati 6 cloni indipendenti (MDA-C-100; MDA-PRUNE clone #3 e #4; MDA-H1-177-PRUNE clone #7 e #8; MDA-H1-177). I cloni MDA di h-PRUNE mostrano un aumento di due volte della motilità quando comparata alla linea cellulare di controllo MDA-C100 (figura 3, pannello D).

I valori osservati per il clone di PRUNE MDA-H1-177 sono aumentati di 2,2 volte rispetto alla linea cellulare MDA-H1-177, iperesprimente nm23H1 sola (figura 3, pannello D). Il valore osservato per il clone MDA-H1-177 è ridotto almeno del 40% rispetto alla linea cellulare MDA-C100, come descritto precedentemente (Hartsough et al., 2001), confermando quindi il ruolo di nm23-H1 nella inibizione della motilità cellulare.

Allo scopo di studiare il contributo della attività PDE di h-PRUNE alla motilità cellulare è stato condotto un saggio di motilità su MDA-C100, MDA-H1-177, MDA-PRUNE (clone #3 e #4), MDA-PRUNE $\Delta$  (clone #10 e #11) e MDA-PRUNE4D $\Delta$  (clone #19 e #20). Sono stati scelti questi mutanti a causa della loro differente abilità nell'influenzare l'attività PDE di h-PRUNE.

È stata osservata una diminuzione del 40% della motilità cellulare nei cloni MDA-PRUNE $\Delta$  e quasi una completa diminuzione

(90%) in MDA-PRUNE4DΔ entrambi comparati rispetto ai cloni stabili di MDA-PRUNE per verificare se l'attività PDE di h-PRUNE contribuisce da sola alla motilità cellulare nelle linee cellulari di cancro alla mammella, sono stati testati i cloni che sopra esprimono una PDE (PDE5A) ben caratterizzata in MDA-C100 (MDA-PDE5A clone #14 e #16). Nessun aumento della motilità cellulare è stato osservato in entrambi i cloni iperesprimenti PDE5A (figura 3, pannello E) indicando quindi che solo l'attività PDE di h-PRUNE è capace di indurre la motilità cellulare in questo modello cellulare convenzionale.

Inoltre, è stato riportato (Freije et al., 1997, Hartsough et al., 2001, Freije et al., 1997) che le proteine nm23H1-S120G (un mutante che non interagisce con h-PRUNE) (Reymond et al., 1999) e nm23H1-P96S, un mutante che mantiene la sua abilità a legare h-PRUNE, sono capaci di indurre motilità cellulare.

E' stato verificato il ruolo di h-PRUNE nei mutanti iperesprimenti l'attività di motilità cellulare con o senza h-PRUNE e questo è stato correlato alla motilità cellulare. I cloni di PRUNE MDA-nm23H1-S120G mostrano quasi il 60% di aumento nella motilità come paragonato alla line celulare di controllo MDA-C100, mentre i cloni di PRUNE MDA-nm23H1-P96S mostrano un aumento del 200% nella motilità quando comparata alla cellule MDA-C100 (figura 3, pannello F).

In conclusione, i risultati indicano che l'iperespressione di h-PRUNE nelle cellule MDA-C100 aumentano la loro motilità cellulare. H-PRUNE è capace di far regredire l'effetto anti-motilità di nm23-H1, promuovendo in questo modo la motilità cellulare. Questo effetto non è

www.elsevier.com/locate/bsc

osservato quando h-PRUNE è iperespresso in presenza del mutante nm23H1-S120G che non interagisce con h-PRUNE, postulando quindi il ruolo del complesso nm23-H1-h-PRUNE sull'aumento della motilità cellulare.

#### Attività PDE di h-PRUNE *in vitro* e *in vivo*

Considerando che h-PRUNE ed nm23-H1 interagiscono fisicamente (Mac Donald et al., 1996), è stata verificata la possibile influenza di nm23s sull'attività di PDE di h-PRUNE e il significato biochimico dell'interazione nm23-h-PRUNE. Ciò è stato raggiunto preincubando nm23-H1 con la proteina purificata h-PRUNE e misurando l'attività di cAMP-PDE *in vitro*.

L'attività PDE di h-PRUNE ha mostrato fino a un aumento di 2 volte rispetto al controllo in presenza di nm23-H1. Inoltre, per verificare che questo aumento di attività fosse dovuto ad una interazione fisica, sono stati testati differenti mutanti nm23. Il mutante che non interagisce nm23H1-S120G (figura 4, pannello A) non era in grado di aumentare l'attività PDE di h-PRUNE; in contrasto, il mutante interagente nm23H1-P96S aumentava l'attività PDE di h-PRUNE quasi come il wild type nm23-H1, sebbene in modo minore. Questo è possibile a causa della più bassa affinità di legame con h-PRUNE, precedentemente riportata (Reymond et al., 1999).

Come ulteriore esperimento di controllo, è stata testata l'attività PDE di h-PRUNE  $\Delta$  in presenza della proteina nm23-H1 poiché queste due proteine non interagiscono mediante saggi di coimmuno



precipitazione. Non si è osservato alcun aumento nella attività PDE di h-PRUNE $\Delta$  misurata (figura 4, pannello A).

Questi risultati dimostrano una correlazione tra l'interazione fisica diretta di h-PRUNE e nm23-H1 e l'aumento della attività PDE di h-PRUNE. Inoltre, ciascun clone stabile usato nel saggio di motilità è stato analizzato per l'attività specifica cAMP-PDE di h-PRUNE sulla proteina immuno-precipitata (figura 4, pannello B).

Mediante queste analisi, i cloni MDA di PRUNE hanno un aumento di attività cAMP-PDE di 8 volte rispetto al clone MDA-C100. Invece, i cloni MDA-PRUNE $\Delta$  hanno una diminuzione dell'attività cAMP-PDE di 0,5 volte rispetto ai cloni di PRUNE MDA e ciò è correlato alle loro proprietà di motilità cellulare (figura 4, pannello B).

Inoltre, è stato trovato che l'attività PDE di h-PRUNE in cloni MDA di h-PRUNE comparata all'attività dei cloni stabili doppi MDA-H1-177-PRUNE è aumentata di 1,4 volte (figura 4, pannello B).

Questi risultati mostrano una diretta correlazione di attività PDE di h-PRUNE alla motilità cellulare. Inoltre, i cloni MDA-nm23H1-S120G-PRUNE hanno una diminuzione di 3 volte dell'attività PDE di h-PRUNE rispetto ai cloni di MDA-nm23H1-P96S-PRUNE, indicando una correlazione diretta tra l'attività cAMP-PDE di h-PRUNE, la motilità cellulare e le interazioni proteina-proteina. In conclusione, è stata notata una diretta correlazione tra la funzione PDE di h-PRUNE e le interazioni proteina-proteina, che risulta in una influenza significativa sulla motilità cellulare.

RECEIVED  
JAN 10 1997  
FBI - NEW YORK

Studi sull'inibitore PDE di h-PRUNE e influenza sulla motilità cellulare

Per identificare il ruolo fisiologico dell'attività cAMP PDE di h-PRUNE nella cellula è stata testata una serie di inibitori PDE selettivi ed è stato verificato se essi influenzano l'attività della proteina h-PRUNE.

La capacità di h-PRUNE di idrolizzare c-AMP è stata inibita selettivamente mediante dipiridamolo (già noto per agire contro PDE5, PDE6, PDE9, PDE10 e PDE11). La  $IC_{50}$  misurata per l'inibizione del dipiridamolo di attività PDE di h-PRUNE era  $0,78 \pm 0,05 \mu M$  e questo valore è inferiore (più alta specificità) agli altri valori di inibizione delle altre PDE selettive (PDE5, PDE9, PDE10). Tranne nel caso delle PDE6 e PDE11 che hanno un valore  $IC_{50}$  più basso comparato al valore  $IC_{50}$  di h-PRUNE (figura 5, pannello A).

H-PRUNE è risultata anche moderatamente sensibile a IBMX (3-isobutil, 1-metilxantina) ( $IC_{50}$ ;  $40,2 \pm 0,8 \mu M$ ) un inibitore PDE specifico non-selettivo e alla vinpocetina ( $IC_{50}$ ;  $22,3 \pm 1,1 \mu M$ ) un inibitore specifico della PDE1C.

Diversi altri inibitori usati in questo studio non influenzano l'attività di idrolisi di h-PRUNE del c-AMP, anche quando applicati a concentrazioni 100 volte più alte rispetto a quelle definite come loro valori di  $IC_{50}$  contro le altre PDE. I risultati degli studi di inibizione sono riassunti nella figura 5, pannello A.

I dati mostrati sopra sono stati ulteriormente verificati nella linea cellulare di cancro alla mammella MDA-MB-435, allo scopo di studiare l'inibizione fisiologica *in vitro*.

E' stato scelto di usare cloni MDA iperesprimenti h-PRUNE e, come controlli aggiuntivi cloni MDA-PRUNE $\Delta$ , a causa di una parziale riduzione (40 %) dell'attività PDE di h-PRUNE come discusso sopra (figura 2, pannelli A e B), per verificare fino a che punto il dipiridamolo è in grado di inibire le loro attività per correlarle alla motilità cellulare.

Entrambi i cloni MDA-PRUNE e PRUNE $\Delta$  sono stati incubati con dipiridamolo (8 $\mu$ M, una concentrazione più alta di 10 volte rispetto al suo IC<sub>50</sub>) per 24 ore per ottenere l'inattivazione enzimatica completa e successivamente è stato ripetuto il saggio di motilità come descritto sopra.

Dopo il trattamento con il dipiridamolo, i cloni MDA-PRUNE e MDA-PRUNE $\Delta$  hanno mostrato una riduzione nella media del 40 % e del 20 % nella motilità, rispettivamente, mostrando che l'inibitore agisce contro l'attività PDE di h-PRUNE interferendo su una diminuzione sostanziale nella motilità cellulare (figura 5, pannello B).

#### Studio di carcinoma alla mammella su pazienti affetti da metastasi

Per verificare *in vivo* il ruolo oncogenico della h-PRUNE sono stati selezionati in modo random 59 casi nei quali sono state riportate metastasi (TxNxMI in accordo alla classificazione TNM che descrive l'estensione anatomica della malattia (Hejna et al., 1999)).

L'analisi è stata condotta su array di tessuto multiplo (TMA) contenente espianti di tessuto di tumore primario che hanno mostrato metastasi al tempo della diagnosi o durante il follow-up (almeno 5 anni di follow-up; data di diagnosi: 1992-97).

Le analisi FISH, usando un PAC contenente h-PRUNE (279-H19) come sonda, hanno rivelato 22 casi di tumore su 59 (37%) con trisomia o numero di copie superiore, indicando l'amplificazione della regione genomica di h-PRUNE. E' stata osservata solo una disomia e nessuna amplificazione in un totale di 55 casi analizzati usando un PAC contenente nm23-H1 come sonda (figura 6, pannello A).

Inoltre, sono state condotte analisi immuno-istochimiche su TMA usando due anticorpi (A59, K73) che riconoscono h-PRUNE e nm23-H1, rispettivamente. Sono stati riportati i risultati di FISH e analisi immuno-istochimiche di tessuto normale o di tessuto di tumore non metastitico.

Secondo la classificazione immuno-istopatologica, in tutti i 22 casi (37%) dopo amplificazione citogenica della regione cromosomica di h-PRUNE si evidenziava anche un'alta espressione di proteina h-PRUNE in contrasto con il livello di espressione basso o moderato di nm23-H1, suggerendo in questo modo che circa un terzo della formazione di metastasi alla mammella può essere dovuto a entrambe l'amplificazione di h-PRUNE e all'iperespressione con concomitante diminuzione del livello della funzione di soppressore della metastasi di nm23-H1.

CONFIDENTIAL



I nucleotidi mutati sono segnati in corsivo ed il codone alterato è sottolineato. Tutte le mutazioni sono confermate mediante sequenziamento del DNA.

Per studiare l'influenza del tampone sull'attività PDE di h-PRUNE è stato modificato il saggio PDE, utilizzando 50 mM Tris HCl, pH 7,4 o 50 mM tampone HEPES, pH 7,5 con concentrazioni crescenti

( 0, 1, 2, 4, 8, 16 e 32 mM) di  $MgCl_2$ .

Per studiare l'influenza della presenza di ioni sono stati effettuati saggi PDE in 50 mM in tampone HEPES, pH 7,5 (per evitare le reazioni di ossido-riduzione) a concentrazioni crescenti (1, 2, 4, 8, 16, 32 e 64 mM) di sali di  $MgCl_2$  o  $MnCl_2$ . Come controllo negativo, è stato impiegato h-PRUNE $\Delta$  nelle stesse condizioni impiegate per h-PRUNE. L'attività di h-PRUNE in assenza di ioni è stata testata dopo dialisi intensiva della proteina contro 50 mM Tris-HCl, pH 7,4, 1,7 mM EGTA o 50 mM tampone HEPES, pH 7,5, 1,7mM EGTA.

L'influenza dell'attività di nm23 (NDPK) sull'attività PDE di h-PRUNE è stata studiata effettuando i saggi preincubando h-PRUNE con le diverse nm23 (resa di purificazione 70%, -H1, -h1-S120G o -H1-P96S).

E' stata testata la possibile influenza di nm23-H1 su nm23-H1 preincubando la proteina mutante purificata con nm23-H1 ed effettuando il saggio PDE.

Per gli studi degli inibitori, sono stati testati otto potenziali candidati: cilostamide, dipiridamolo, 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX), milrinone, rolipram, vinpocentina, sulindac e zaprinast (Sigma).

E' stata impiegata una bassa concentrazione di c-AMP (0,01  $\mu$ M) per approssimare la  $IC_{50}$  alla  $K_i$ . Tutti gli esperimenti di inibizione sono stati condotti in triplicato e ripetuti per tre volte.

#### Analisi dei cloni stabili

I c-DNA di h-PRUNE, h-PRUNE $\Delta$  e h-PRUNE4D $\Delta$  sono subclonati all'interno del vettore pBABE digerito con EcoRI/XhoI



Per allestire le linee bulk transfettate le piastre contenenti un centinaio di colonie resistenti alla puromicina sono state tripsinizzate e le linee cellulari sono state così allestite.

Per l'analisi PCR Real Time i cloni cellulari singoli (linee cellulari MDA C-100, MDA-H1-177, MDA-nm23H1-S120G e MDA-nm23H1-P96S, diversi cloni stabili h-PRUNE e h-PRUNEΔ) sono stati piastrati ad una concentrazione di  $7-9 \times 10^6$  cellule in beute da  $75\text{cm}^2$ .

L'm-RNA è stato estratto e purificato con TRIZOL® (Invitrogen) e quindi testati con sistema di rivelazione quantitativa PCR Real Time TaqMan utilizzando uno strumento ABI PRISM 7000 (Applied Biosystems). Coppie di primer per i geni sono state sintetizzate (Applied Biosystems: NME1-P/N 4331182; GAPDH) e Assay on Design è stato impiegato per disegnare la sequenza della sonda 6FAM (6-carbossifluoresceina) sia per il gene h-PRUNE sia per il gene h-PRUNEΔ:

6FAM-CTGCATGGAACCCATC;

FOR: AGAGATCTTGGACAGGCAAACCT;

REV: CCATGTTGACACAGTCCAGGAT.

Diversi cloni sono stati selezionati e testati per la loro espressione di livelli di m-RNA mediante analisi quantitativa ed estrapolazione numerica del numero di copie, rispetto ai geni-bersaglio di riferimento (GAPDH).

Per l'analisi Western Blot, sono stati analizzati 15 µg di lisato proteico in tampone in SDS-PAGE su gel di poliacrilamide al 10% (peso/volume) o al 12,5% (peso/volume) e sono elettroblottati su una membrana PVDF (Immobilon-P, Millipore). I lisati sono stati immunorivelati con anticorpo h-PRUNE policlonale specifico (A59, contro la regione del motivo III) per h-PRUNE e con l'anticorpo nm23-H1 (clone NM301, specifico per l'isoforma H1; Santa Cruz) per nm23-H1 e con l'anticorpo Penta-His contro His-tag (QIAGEN) per PDE5A.

Dopo l'incubazione con IgG antimurine marcate con horseradish perossidasi, è stata effettuata la visualizzazione con intensa



chemioluminescenza (Amersham). Sono state selezionate undici linee cellulari, MDA-PRUNE (clone #3 e #4), MDA-H1-177-PRUNE (clone #7 e #8), MDA-nm23H1-S120G-PRUNE (clone #2 e #3), MDA-nm23H1-P96S-PRUNE (clone #4 e #5) e MDA-PRUNE $\Delta$  (clone #11), MDA PRUNE4D $\Delta$  (clone #19), MDA-PDE5A (clone #14), e le proteine sono normalizzate in Western Blot.

#### Saggio di motilità cellulare *in vitro*

E' stata usata la tecnologia trans-well (6 pozzetti- Corning-Costar). Nei pozzetti inferiori, sono stati incubati 2,5 ml di DMEM contenenti 0,1% BSA, 100 Unità/ml di penicillina, 100  $\mu$ g/ml di streptomicina, 5 mM tampone HEPES (terreno di motilità) ed il chemioattrattore diluito; nei pozzetti superiori sono stati incubati per 3 ore a 37°C con 5% CO<sub>2</sub>. Dopo la metodologia di attrazione, le cellule sono state fissate e colorate con soluzione Gill n°1 di ematossilina seguendo il protocollo del produttore (Corning-Costar); le cellule sono state contate al microscopio.

#### Analisi FISH

PAC 279-H19 (PRUNE-cromosoma 1q21.3) e PAC nm23-H1 (nm23H1-cromosoma 17q21) marcati con nick-translation con d-UTP-Cy3 (rosso) ed il controllo pUC177 marcato con nick-translation con d-UTP-FluorX (verde) su sezioni di tessuto sottili 4mm fissate con la formalina ed imbevute in paraffina (pUC177 è stato fornito dal Dr. Rocchi).

I nuclei sono stati trattati con un colorante di contrasto 4'-6-diamidino-2-fenil-indolo (DAPI). Due distinti esperimenti sono stati

condotti in ogni caso. Le immagini digitali sono state captate utilizzando un microscopio computerizzato Olympus ad epifluorescenza dotato di software Cytovision e schermo COHU. I segnali di ibridazione nei nuclei intatti, preservati e non sovrapposti, sono stati valutati da due diversi ricercatori indipendenti.

#### Analisi IHC

I tumori MDA sono stati immunorivelati con uno specifico anticorpo policlonale A59 h-PRUNE e con l'anticorpo nm23-H1 (clone K73, specifico per le isoforme H1 e H2; Apotech Corporation, CH).

L'intensità della colorazione immunoistochimica è stata impiegata per classificare i campioni tumorali come positivi se presente almeno il 20% di cellule analizzate al microscopio (forte +++, moderato ++, leggera colorazione diffusa + o negativo 0 (assente o leggera colorazione focale)) per l'espressione delle proteine h-PRUNE e nm23-H1.

#### Collezione di casi tumorali e selezione TNM

I casi di tumore sono stati raccolti dalla AUSL1 di Sassari includendo i pazienti con un decorso minimo di 5 anni. Il sistema di classificazione TNM si applica a tale studio e come descritto da Sobin (Hejna et al., 1999) è stato usato per descrivere l'estensione anatomica della patologia e si basa sulla valutazione di tre componenti: T corrisponde all'estensione del tumore primario (da T0 a T4), N corrisponde all'assenza o presenza e all'estensione delle metastasi a livello dei linfonodi locali (da N0 a N4) ed M indica l'assenza o la presenza di metastasi a distanza (M0 o M1). La collezione di 59 casi di

tumori alla mammella è stata caratterizzata come TxNxM1 positiva.

#### Espressione genica in cloni cellulari della mammella

La preparazione delle sonde è stata effettuata secondo la seguente procedura.

L'RNA è stato estratto dai cloni MDA-H1-177-PRUNE (clone #8) e MDA-H1-177 mediante metodo TRIZOL®. I templati di RNA totale variabile tra i 15 e 20 µg sono stati marcati utilizzando il Kit Amersham CyScribe First Strand c-DNA Labelling con le seguenti modifiche.

Il tempo per la trascrizione inversa è stato aumentato a tre ore. La sonda è stata digerita con Rnase-H per 30 minuti a 37°C.

Al fine di eliminare l'RNA residuo, le reazioni sono state incubate con 0,25 M NaOH per 20 minuti e quindi neutralizzate con 2,8 M di MOPS. La quantità di colorante Cy incorporata è stata calcolata sia per Cy5 sia per Cy3. Quantità uguali dei bersagli marcati Cy5 e Cy 3 sono state unite ed ibridizzate sui vetrini.

Le sonde con meno di 50 pmoli di colorante Cy incorporato non sono state usate per l'ibridazione.

Sui vetrini è stato applicato un protocollo standard per l'ibridazione e sono stati condotti due esperimenti indipendenti.

#### Analisi e scansione immagini

La scansione e le analisi delle immagini sono state condotte, rispettivamente, mediante Medway Far 2000-I e mediante Array Pro software dalla Media Cybernetics. La sensibilità della scansione è stata mantenuta tra 900 e 1000 per compensare sia l'effetto saturazione sia la bassa intensità. Le immagini di 16 bit sono state trattate.



livello del clone MDA-H1-177 PRUNE (clone #8) rispetto al clone MDA H1-177, come mostrato nella tabella 1. La tabella 1 riassume gli esperimenti array condotti su cloni cellulari di mammella stabili; sono riportati nelle colonne da sinistra a destra: l'identificazione dei geni con il numero ID, numero di riferimento Unigene e la posizione sui cromosomi umani; il rapporto tra i dati degli array dei cloni MDA-H1-177 / MDA-H1-177-PRUNE clone #8 dopo due esperimenti indipendenti condotti in duplicato; valore del T-test , inclusa la deviazione standard ed il valore p; riferimenti bibliografici dei geni; processi di metastasi corrispondenti.



|                                                                                                                                 |          |             |   |        |        |          |        |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |                                    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------|-------------|---|--------|--------|----------|--------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------|
| 256005:N31521:266005:Hs.1986<br>89:antigene bullous pemphigoid<br>1, 230/240kDa :BPAG1:6: 6p12-<br>p11                          | 0,777258 | 0,787968285 | 2 | 0,7825 | 0,0098 | -35,8148 | 0,0177 | Brown A; Bernier G; Mollnes M; Rossant J; Kishony R;<br>The mouse dysplasia-necrosis gene is a novel isoform of<br>bullous pemphigoid antigen 1. <i>Nature Genet.</i> 10: 301-305, 1995                                                                                                                                                                                      | Organizzazione<br>citoschelettrico |
| 278764:N98784:278764:Hs.1484<br>95:proteasoma (prosome,<br>macropain) subunità 26S, non-<br>ATPasi, 4: PSMD4:1:1q21.1           | 0,695804 | 0,681432388 | 2 | 0,6885 | 0,0147 | -35,7552 | 0,0178 | Devenux, C.; Jensen, C.; Rochester, M.; Molecular<br>cloning and expression of a 26 S protease subunit enriched in<br>lysosome raposa. <i>J. Biol. Chem.</i> 270: 23726-23729, 1995.<br>PubMed id: 7559544                                                                                                                                                                   | Degradazione proteica              |
| 5455117:BM911128:5455117:<br>Hs.111779:proteina secreta,<br>acidia, ricca di cisteina<br>(osteonectina): SPARC:5:5q31.3-<br>q32 | 1,472603 | 1,515475276 | 2 | 1,4938 | 0,0202 | 27,9731  | 0,0227 | Biochem Biophys Res Commun 2001; Sep 21;287(2):422-6<br>Induction of SPARC by VEGF in human vascular endothelial<br>cells.<br>Kato Y, Lewalle BA, Baba Y, Tejada M, Sakai M, Baba M,<br>Kobayashi K, Kozhima S, Nagashima Y, Frankel F, Noi A,<br>Frieden IJM, Heit RL                                                                                                       | Angiogenesi                        |
| 321313:W32180:321313:Hs.3872<br>54                                                                                              | 0,699574 | 0,671066627 | 2 | 0,6851 | 0,0294 | -18,1757 | 0,0349 | Silgali C, De Luca A, Cascone I, Shubert V, Fuen T, Ponzone<br>R, Biglia N, Audero E, Arico R, Buscuso F, Samad P, De<br>Borja M, Roldan Arices, Liria<br>Angiopoietin-2 expression in breast cancer correlates with<br>lymph node invasion and short survival. <i>Int J Cancer.</i> 2003 Feb<br>1;103(4):465-74.                                                            | Angiogenesi                        |
| 320701:W32046:320701:Hs.5415                                                                                                    | 0,772313 | 0,74904281  | 2 | 0,7605 | 0,0216 | -17,8901 | 0,0355 | Silgali C, De Luca A, Cascone I, Bonello V, Fuen T, Ponzone<br>R, Biglia N, Audero E, Arico R, Buscuso F, Samad P, De<br>Borja M, Roldan Arices, Liria<br>Angiopoietin-2 expression in breast cancer correlates with<br>lymph node invasion and short survival. <i>Int J Cancer.</i> 2003 Feb<br>1;103(4):465-74.                                                            | Angiogenesi                        |
| 300555:W07526:300555:Hs.2936<br>: metalloproteinasi matrice 13<br>(collagenasi 3): MMP13:11:<br>11q22.3                         | 1,094073 | 1,105961019 | 2 | 1,1    | 0,0076 | 17,5383  | 0,038  | De Cesar Lucero JM, Vivas Prieto F, Gonzalez Sanchez<br>LO, Martin Suarez A, Gava R, Cuesta Fernandez E, Diaz<br>Sanchez MC Related Articles, Links<br>Santibañan MC Related Articles, Links<br>[Expression and clinical significance of collagenase-3 (MMP-13)<br>in gastric cancer] <i>Gastroenterol Hepatic.</i> 2003 Jun;28(1):7-17.<br>Spanish. COLLAGENASE 3 PRECURSOR | Metastasi                          |

Libreria di Biologia Molecolare e Cellulare

|                                                                                                                  |          |             |   |        |        |          |        |                                                                                                                                                                                                                                                                                    |             |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------|-------------|---|--------|--------|----------|--------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------|
| 429533:AA011457:429533:HS.23<br>7617: dipeptidilpeptidasi B:<br>DPP9:19: 19p13.3                                 | 1,185238 | 1,164378858 | 2 | 1,1752 | 0,0131 | 17,3549  | 0,0388 | IV Ocan C, Wagtmann N.<br>Identification and characterization of human DPP9, a novel<br>homologue of dipeptidyl peptidase IV.<br>Gene. 2002 Oct 18;292(1-2):185-93.                                                                                                                | metastasi   |
| 4747535:BG676028:4747535:HS.<br>89626: ormone simile all'ormone<br>delle paratiroidi:<br>PTHLH: 12:12p12.1-p11.2 | 0,844871 | 0,951010591 | 2 | 0,8479 | 0,0045 | -16,5187 | 0,0385 | Urbani R, Anderson N, Hoy R, Nair T, Conway S, Brady G,<br>Acherit L, Burrows N.<br>Overexpression of parathyroid hormone-related protein and its<br>receptor in early breast cancer predicts poor patient survival.<br>Clin Cancer Res. 2002 Oct 15;10(10):3172-7. PMID: 12374665 | Metastasi   |
| 504278:AA149501:504278:HS.33<br>2405:arginasi, fegato: ARG1<br>:6:6q23                                           | 1,391833 | 1,329405384 | 2 | 1,3602 | 0,0324 | 13,4083  | 0,0473 | Davis LE, Jasna MA, de la Torre E, Golsh T, Elament M,<br>Majumdar G, Saccubolo da Lualig E, Sells ME. Arginine<br>metabolic pathways involved in the modulation of tumor-induced<br>angiogenesis by macrophages. FASEB J. 2002 Dec 4;16(21):<br>2118-20.                          | Angiogenesi |
| 127468:R08943:127468:HS.2691<br>81:ESTs, Simile alla placofilina 2                                               | 1,34385  | 1,378604879 | 2 | 1,3611 | 0,0180 | 241,491  | 0,0263 | Phosphatases 2a and 2b: constitutive proteins of dual location in<br>the keratoplasm and the desmosomal plaque. JOURNAL<br>Cell Biol. 195 (4): 1009-1025 (1985) PUBMED<br>8022383/ENQUIRE 9708:10:                                                                                 | Adesione    |



Sono stati selezionati alcuni geni, coinvolti nei processi di metastasi e di oncogenesi e significativamente alterati nell'analisi di espressione genica, confermando il loro livello di espressione mediante un metodo alternativo.

Gli esperimenti PCR Real Time sono stati condotti su 11 geni (le coppie di primer per i geni sono state selezionate dalle sequenze ID Genebank). Si è rivelato che sette di questi geni selezionati sono regolati in modo positivo e quattro sono regolati in senso negativo nel clone MDA-H1-177-PRUNE (clone #8). Tale espressione genica differenziata a livello dei cloni stabili iperesprimenti h-PRUNE, la cui espressione è stata confermata sia mediante chip-array sia mediante PCR Real Time, è riportata nella tabella 2.

E' stato trovato nei modelli cellulari sopra descritti che la regolazione positiva dei geni noti per essere coinvolti nella riorganizzazione del citoscheletro (fosfatidilinositolo 4 chinasi tipo II), l'attivazione di proteasi (subunità 26S proteasoma, proteina di legame Nedd4), oncogenesi (L-plastina, RAB1B, proteina associata BRACA1 (BRAP2), fosforilazione di proteine e trasporto nucleare (proteina di interazione 1-CKIP1 della Casein chinasi II).

Invece una regolazione negativa è stata riscontrata per quattro geni coinvolti nei contatti con la matrice extracellulare o nell'adesione cellulare (Plakofilin, LIM), riorganizzazione del citoscheletro (Plakin) e nell'attività oncosoppressoria (EXT1) e tali evidenze sono riportate nella tabella 2. Questa tabella riporta la differente espressione genica

in cloni MDA stabili iperesprimenti h-PRUNE; sono riportati nelle colonne da sinistra a destra: L'identificazione Genebank ID; il nome del gene; il rapporto tra i valori di espressione degli array clone #8 / clone #177 dopo due esperimenti indipendenti condotti in duplicato; il valore P per l'espressione dell'array; il rapporto tra i valori di espressione degli array clone #8 / clone #177 valutato mediante Real Time PCR; il valore P per la Real Time PCR; il processo biologico cellulare correlato.

CC-BY-NC-ND 4.0 International license

Tabella 2

| Sovraespressi |                                       | Rapporto tra i valori di espressione array | valore P | Rapporto tra i valori di espressione real time (clone #8/clone 177) | valore P | Processo biologico cellulare  |
|---------------|---------------------------------------|--------------------------------------------|----------|---------------------------------------------------------------------|----------|-------------------------------|
| ID (genebank) | nome gene                             |                                            |          |                                                                     |          |                               |
| NM_030981.1   | RAB1B ras famiglia                    | 0.6902                                     | 0.0184   | 0.4005                                                              | 0.0001   | Oncogenesi                    |
| BT007330.1    | Fosfatidilinositolo chinasi 4 tipo II | 0.3933                                     | 0.0017   | 0.2230                                                              | 0.0013   | Riarrangiamento citoscheletro |
| AF035620.1    | Braca 1 proteina associata (BRAP2)    | 0.7563                                     | 0.0027   | 0.0670                                                              | 0.0062   | Oncogenesi                    |
| M22300.1      | Plastina                              | 0.7491                                     | 0.0078   | 0.0990                                                              | 0.0001   | Oncogenesi                    |
| NM_018177.2   | NEDD4 proteina di legame 2 (NAPB2)    | 0.7567                                     | 0.0145   | 0.2230                                                              | 0.0001   | attivazione proteasi          |
| NM_016274.3   | CK2 proteina di interazione CKIP 1)   | 0.7929                                     | 0.0161   | 0.3499                                                              | 0.0004   | Proliferazione                |
| XM_208021.1   | 26-s proteasoma                       | 0.6886                                     | 0.0178   | 0.4475                                                              | 0.0044   | Attivazione proteasi          |

| Sottoespressi |                                    | Rapporto tra i valori di espressione array | valore P | Rapporto tra i valori di espressione real time (clone #8/clone 177) | valore P | Processo biologico cellulare |
|---------------|------------------------------------|--------------------------------------------|----------|---------------------------------------------------------------------|----------|------------------------------|
| ID (genebank) | nome gene                          |                                            |          |                                                                     |          |                              |
| R08943.1      | EST R08943 simile alla placofilina | 1.3611                                     | 0.0263   | 2.9180                                                              | 0.4764   | Adesione cellulare           |
| AF061258.1    | LIM                                | 1.1717                                     | 0.0145   | 3.0525                                                              | 0.0092   | Adesione cellulare           |
| BC001174.1    | EXT1                               | 2.1573                                     | 0.0398   | 2.9588                                                              | 0.0623   | Soppressione tumorale        |
| NM_001723.2   | PLAKIN                             | 0.7826                                     | 0.0178   | 0.5625                                                              | 0.0619   | organizzazione citoscheletro |

Riassumendo, i geni coinvolti nei processi legati all'oncogenesi hanno rivelato una significativa alterazione nei loro livelli di espressione, indicando così un contributo determinante di h-PRUNE all'elevato potenziale oncogenico di questa linea cellulare di cancro alla mammella.

## CONCLUSIONI

Le analisi strutturali basate sulle due proteine appartenenti alla superfamiglia DHH, ossia RecJ nucleasi e pirofosfatasi inorganica, suggeriscono che h-PRUNE probabilmente possiede una attività fosfoesterasica ione metallico-dipendente. A causa della analisi strutturale della famiglia DHH e studi evoluzionistici sul folding delle fosfodiesterasi, è stato dimostrato che h-PRUNE di mammifero possiede una attività fosfoesterasica nucleotide ciclica.

Poiché h-PRUNE interagisce con l'isoforma nm23-H1 che ha attività NDPK, che è nota per funzionare sui nucleotidi, si è focalizzata l'attenzione sulla caratterizzazione dell'attività fosfodiesterasica a carico dei nucleotidi ciclici e il suo ruolo nella trasduzione del segnale. Il mutante h-PRUNE $\Delta$  che contiene sostituzioni nucleotidiche a livello del modulo III conservato della famiglia DHH mostra una riduzione dell'attività PDE (figura 2, pannelli A, B, F).

Analisi di mutazioni singole o multiple in diversi siti indicano che solo mutazioni a carico dell'istidina (127), dell'arginina (128), e della prolina (129) del modulo III e dell'acido aspartico D28, D126, D179 presenti rispettivamente nei moduli I, III e IV si sono mostrate influenti in modo sostanziale sull'attività PDE di h-PRUNE, indicando

probabilmente il loro coinvolgimento diretto nel sito catalitico PDE h-PRUNE.

La regione conservata del modulo III è responsabile per il legame di ioni  $Mg^{2+}$  come previsto mediante studio dei modelli proteici (figura 1, pannello B) ed inoltre un saggio funzionale *in vitro* è stato osservato che h-PRUNE è anche in grado di funzionare in assenza (figura 2, pannello E) o a basse concentrazioni di ioni metallici (figura 2, pannello F).

E' stato dimostrato che i livelli di h-PRUNE e della proteina nm23s sono sbilanciati nel sarcoma e nel carcinoma alla mammella, suggerendo che h-PRUNE può regolare negativamente la funzione anti-metastatica di nm23-H1. Un aumento nell'espressione di h-PRUNE è direttamente correlato all'aggressività di questi tumori e alla progressione della patologia (Forus et al., 2001). Poiché diverse relazioni hanno postulato che l'attività anti-metastatica di nm23-H1 è indipendente dalla attività di NDPK (Steeg et al., 1993, Wagner 1997), abbiamo verificato l'influenza che h-PRUNE ha sulla motilità cellulare, che rappresenta una delle prime funzioni cellulari da acquisire dalle cellule tumorali per migrare dal sito primario del tumore stesso.

Allo scopo di confermare che l'attività PDE di h-PRUNE è direttamente coinvolta in questi fenomeni, l'h-PRUNE, h-PRUNE $\Delta$  e h-PRUNE4D $\Delta$  sono state iperespresse in un modello di cancro alla mammella, ed è stato osservato che l'iperespressione della proteina wild type induce la motilità cellulare, mentre una diminuzione della sua

funzione PDE (h-PRUNE $\Delta$ , h-PRUNE4D $\Delta$ ) corrisponde ad una diminuzione della motilità cellulare.

Invece, è stato osservato per il mutante h-PRUNE4D $\Delta$  un 80 % di riduzione dell'attività PDE e l'iperespressione nel clone MDA non causa un aumento significativo della motilità cellulare, escludendo che altre potenziali attività di h-PRUNE sono responsabili dell'aumento di motilità.

Sebbene nessun'altra PDE intracellulare caratterizzata sia stata associata alla migrazione cellulare è stato investigato se l'aumento della attività PDE nei cloni stabili MDA possa contribuire alla motilità cellulare. Allo scopo di verificare ciò, PDE5A è stato iperespresso, nello stesso modello cellulare e testato per l'influenza sulla motilità cellulare. PDE5A, scelto per la sua sensibilità al dipiridamolo (IC<sub>50</sub> 0,9  $\mu$ M), non influenza la motilità delle cellule di mammella MDA, indicando che solo la funzione PDE h-PRUNE è responsabile dell'aumento della motilità cellulare nelle cellule di tumore alla mammella.

Inoltre, è stato osservato che la iperespressione di h-PRUNE in un contesto di elevata espressione di nm23-H1 mostra un fenotipo di motilità cellulare diminuita e una attività PDE di h-PRUNE ridotta se comparata alle cellule iperesprimenti h-PRUNE da sola. Sebbene, l'attività PDE di h-PRUNE è aumentata *in vitro* dopo interazione con nm23-H1 (figura 4, pannello A), questo effetto non è stato osservato *in vivo*. Questi fenomeni possono essere spiegati mediante la presenza di un'alta quantità di nm23-H1 in MDA-H1-177-PRUNE se comparato ai cloni MDA-PRUNE (figura 3, pannello B).

Inoltre, è stato dimostrato che le cellule di cancro alla mammella iperesprimenti h-PRUNE in un sistema di elevata espressione di nm23, quale nm23-H1-S120G, hanno una motilità cellulare più bassa rispetto alle cellule che iperesprimono h-PRUNE in un sistema nm23-H1-P96S.

In questo modo si dimostra ulteriormente che l'interazione fisica tra queste due proteine può essere responsabile per la promozione della motilità. Inoltre, il clone di h-PRUNE-nm23-H1-S120G ha quasi il 66% di attività PDE inferiore se comparata al valore di attività PDE osservato nel clone iperesprimente h-PRUNE e nm23-H1-

P96S (figura 4, pannello B), indicando in modo definitivo una correlazione tra l'interazione proteina-proteina, l'attività cAMP-PDE di h-PRUNE e gli effetti di motilità cellulare.

Allo scopo di capire se gli inibitori di PDE noti sono capaci di funzionare selettivamente contro l'attività PDE di h-PRUNE è stata testata una serie di 8 inibitori di PDE ed è stato trovato che il dipiridamolo è in grado di inibire l'attività PDE di h-PRUNE con un valore di  $IC_{50}$  significativo.

Inoltre, l'uso del dipiridamolo riduce in modo significativo la motilità dei cloni di mammella di h-PRUNE stabili e in misura minore la motilità dei cloni iperesprimenti h-PRUNE $\Delta$  (figura 5, pannello B). E' di opinione comune, che gli anticoagulanti come il dipiridamolo e farmaci simili mostrano la loro funzione interferendo sulla attivazione del pathway della coagulazione del sangue mediante inibizione della adesione delle cellule alle pareti capillari. In vista dei risultati riportati, è ragionevole pensare che l'uso del dipiridamolo può rappresentare un farmaco di prevenzione e trattamento delle metastasi del cancro alla mammella diffuse.

Inoltre, sono stati confermati *in vivo* i dati osservati sulla attivazione *in vitro* della motilità cellulare, usando un numero significativo di campioni di tessuti di tumore alla mammella da pazienti TxNxM1. In 59 tumori da casi che presentano metastasi distali, h-PRUNE è stato trovato amplificato in un numero di copie ed iperespresso in 22 casi (37%), laddove nm23-H1 è stato trovato

www.italianjournalofcancer.com



Nell'insieme questi risultati evidenziano il ruolo della h-PRUNE sulla promozione della motilità cellulare e metastasi che influenza negativamente la funzione anti-metastatica di nm23-H1. Il modello impiegato per lo studio del ruolo di h-PRUNE nella progressione del



THE UNIVERSITY OF CHICAGO

THE UNIVERSITY OF CHICAGO

THE UNIVERSITY OF CHICAGO

THE UNIVERSITY OF CHICAGO

THE UNIVERSITY OF CHICAGO

di 15 anni sono stati resi disponibili per 222 pazienti (media, 138 mesi; intervallo 121-176 mesi).

#### Tissue Multiple Array (TMA)

La costruzione del TMA è stata descritta precedentemente (Simon et al., 2001; Simon et al., 2002).

Riassumendo, cilindri di tessuto con diametro di 0,6 mm sono stati prelevati dalle aree del tumore rappresentativo di un donatore di tessuto usando uno strumento robotico di precisione semiautomatico e posti in 6 differenti blocchi di paraffina ciascuno contenente tra 342 e 522 campioni individuali. Quattro sezioni  $\mu\text{m}$  dei blocchi di TMA risultanti sono stati trasferiti su un sistema di sezioni rivestite (Instrumedics Inc., Hackensack, New Jersey).

#### Immunoistochimica (IHC)

Le sezioni di tessuto imbevute di paraffina e fissate con formalina sono state immunocolorate usando un anticorpo monoclonale specifico anti-h-PRUNE (clone 4G3/4, contro una proteina di fusione ricombinante dall'amminoacido 1 all'amminoacido 351, Apotech Corporation, CH) e un anticorpo anti-nm23-H1 (clone K73, specifico per le isoforme -H1; Apotech Corporation, CH).

L'analisi immunoistochimica è stata condotta utilizzando Vectastain Elite ABC Kit (vector Laboratories Inc.) secondo le istruzioni del produttore e seguendo un protocollo noto (Forus et al., 2001; D'Angelo et al., 2003).

I protocolli IHC ottimizzati sono stati preparati colorando le sezioni di istopatologia di controllo rappresentative di tessuto di

mammella sano. Nei tessuti di mammella normale, la proteina nm23-H1 è omogeneamente espressa dove l'espressione della proteina h-PRUNE è assente o di bassa intensità.

La colorazione è stata valutata semi-quantitativamente usando 54 campioni normali posizionati in modo random in duplicato tra i multiple arrays; le cellule epiteliali normali o i centri dei follicoli linfoidi, quando presenti nella sezione di tessuto, sono stati usati come controlli interni.

L'intensità della colorazione immunohistochimica è stata usata per classificare i campioni di tumore come positivi (da colorazione forte +++ a colorazione moderata ++) o negativi (colorazione assente o debole +) sia per l'espressione di h-PRUNE sia per l'espressione di nm23.

#### Analisi FISH

Le sezioni di TMA imbevute di paraffina sono state trattate secondo protocolli noti (Simon et al., 2002; Muresu et al., 2002).

Il clone PAC 279-H19, che comprende la regione h-PRUNE localizzata sul cromosoma 1q21.3 ed il clone DNA/BAC specifico per il gene nm23-H1 localizzato sul cromosoma 17q21.3 sono stati marcati per nick-translation con dUTP-CY3 (rosso) e sono stati usati come sonde. Il clone pUC177 corrispondente alla regione peri-centromerica sul cromosoma 1q12 e il clone pZ17-14 corrispondente alla regione centromerica del cromosoma 17, sono stati marcati per nick-translation con dCTP-FluorX (verde) e usati come controlli.

I nuclei sono stati colorati con il contrasto con 4',6-diammino-2-

fenil-indolo (DAPI). Due distinti esperimenti sono stati condotti per ciascun caso.

Le immagini digitali sono state raccolte usando un microscopio Olympus BX-61 ad epifluorescenza dotato di un filtro appropriato per l'eccitazione del DAPI, del Cy3 (arancione), o del FluorX (Vysis), e video COHU con un software Cytovision. I segnali di ibridazione su almeno 100 nuclei intatti, ben preservati e non sovrapposti sono stati analizzati da almeno due tecnici.

#### Analisi statistiche

Le seguenti variabili e categorie sono state incluse nello studio: dimensione del tumore primario patologico (pT), stato dei noduli (pN), stato dei recettori degli estrogeni e del progesterone (ER e PR, rispettivamente), età al momento della diagnosi, tipo istologico del tumore, sopravvivenza totale (calcolata iniziando dal momento dell'intervento chirurgico). Alcune di queste variabili non sono state considerate per alcuni pazienti. In particolare, lo stato dei noduli e lo stato dei recettori non erano disponibili per un gran numero di casi poiché queste variabili non sono state richieste per l'inclusione dei pazienti nello studio.

L'analisi dei dati di sopravvivenza è stata condotta mediante un pacchetto statistico Egret (versione 2.0.3). Il modello di regressione Cox è stato condotto usando l'incidenza della mortalità naturale e della mortalità specifica tumorale come censura.

Il tempo di sopravvivenza totale è stato espresso in termini di mesi e le variabili indipendenti (h-PRUNE, nm23-H1, pT, pN) sono

state suddivise in tre gruppi di età: 26-44 (N=187), 45-64 (N=969), e 65-98 (N=953).

Le stime di Kaplan Meier sono state fatte separando i casi N-positivi e N-negativi e suddividendo i dati di espressione di h-PRUNE.

Usando il test Chi-Square di Person, l'immunocolorazione di h-PRUNE e nm23-H1 è stata condotta per associazione con i parametri patologici (tipo di tumore istologico, pT, pN, ER, PR). Il coefficiente esatto per le analisi di proporzione del campione è stato fatto per determinare tutti i parametri significativi (sotto il livello 0,05). Tutte le analisi sono state condotte con il pacchetto statistico SPSS/7.5 per Windows.

### Risultati

La determinazione dei livelli di espressione di h-PRUNE e nm23-H1 e il numero di copie cromosomiali di h-PRUNE è stata condotta su sezioni TMA da tessuti in archivio di 2.109 pazienti con diagnosi di carcinoma alla mammella provata istologicamente e dati di follow-up disponibili.

La maggioranza dei pazienti presentavano un carcinoma a livello del dotto come variante istologica (1.531; 73%) e  $\geq 60$  anni (1.219; 58%) al momento della diagnosi. I dati del follow-up clinico per ciascun paziente erano disponibili, coprendo un periodo medio di 63 mesi (intervallo 2-176); la maggioranza dei pazienti era in vita (1.449; 69%) e solo molti pochi casi erano stati persi nel follow-up (7; 0,3%) al momento dello studio.

L'espressione delle proteine h-PRUNE e nm23-H1 è stata

valutata per analisi immunoistochimica usando due anticorpi specifici (clone Ab monoclonale 4G3/4 e K73, rispettivamente). La figura 9 (pannelli A e B) mostra esempi di colorazione per la proteina h-PRUNE in una serie di multiple tissue array.

Una immunocolorazione citoplasmatica fortemente positiva per la proteina h-PRUNE (mostrata come h-PRUNE+) è stata osservata nella maggioranza dei casi (1.208/2.109; 57%) di tumore testati; una immunocolorazione citoplasmatica positiva per la proteina nm23-H1 è stata osservata in 615 (30%) su 2.061 tumori testati (48 casi non sono stati determinati). Tra i 2.061 tessuti di tumore analizzati per l'espressione di h-PRUNE e nm23-H1, è stata osservata una distribuzione inversa di casi con immunocolorazione positiva [1.180 (57%) carcinomi alla mammella risultavano h-PRUNE+ mentre 615 (30%) casi erano nm23-H1+]. Nella tabella 3 sono riportati i risultati dell'analisi immunoistochimica (IHC) per le proteine h-PRUNE ed nm23-H1 presenti in carcinomi invasivi alla mammella.

Tabella 3

| Analisi IHC      | nm23-H1   |           | Totale |
|------------------|-----------|-----------|--------|
|                  | positivo  | negativo  |        |
| h-PRUNE positivo | 359 (30%) | 821 (70%) | 1180   |
| h-PRUNE negativo | 256 (29%) | 625 (71%) | 881    |

La distribuzione dell'espressione delle proteine h-PRUNE e

nm23-H1 è stata valutata in un sottogruppo di pazienti sulla base di parametri istopatologici differenti. Non è stata osservata alcuna correlazione significativa tra l'espressione di h-PRUNE o nm23-H1 e il tipo di tumore (dotti vs globulare), pT, pN, ER e reattività PR (tabella 4).



Tabella 4

| Parametro                            | N    | Non<br>valutato | h-prune<br>negativo                  | h-prune<br>positivo    | associazione<br>statistica | nm23-H1<br>negativo     | nm23-H1<br>positivo    | Associazione<br>statistica |
|--------------------------------------|------|-----------------|--------------------------------------|------------------------|----------------------------|-------------------------|------------------------|----------------------------|
| Tipo<br>istologico                   | 2109 | 76              | D 621<br>L 117<br>altro 125          | 863<br>174<br>131      | 0.42                       | 1031<br>201<br>167      | 453<br>90<br>89        | 0.46                       |
| dimensione del<br>tumore<br>primario | 2109 | 3               | pT1 319<br>pT2 428<br>pT3 103<br>pT4 | 440<br>51<br>68<br>134 | 0.93                       | 321<br>88<br>167        | 236<br>298<br>39<br>74 | 0.98                       |
| Stato noduli                         | 2109 | 331             | + 384<br>- 375                       | 498<br>521             | 0.37                       | 609<br>639              | 272<br>258             | 0.14                       |
| ER                                   | 2109 | 115             | + 649<br>- 204                       | 882<br><b>259</b>      | 0.34                       | 1076<br>329             | 447<br>142             | 0.41                       |
| PR                                   | 2109 | 224             | + 279<br>- 523                       | 369<br>714             | <b>0.22</b>                | 449<br>871 <sup>*</sup> | 203<br>362             | 0.27                       |

Le analisi di ibridizzazione *in situ* a fluorescenza (FISH) sono state condotte per accertare se l'aumento del livello di espressione di h-PRUNE era dovuto all'amplificazione del numero di copie del gene. Un clone PAC (279-H19) corrispondente alla regione genomica di h-PRUNE sul cromosoma 1q21.3 e un clone di controllo corrispondente alla regione peri-centromerica sul cromosoma 1q12 sono stati usati come sonde. Considerando i casi con almeno due copie di geni per centromero, un livello molto basso dei segnali poligenici di h-PRUNE sono stati osservati in questo set di dati mediante FISH [32 (3,1%) su 1.016 tumori analizzati].

Poiché solo tre copie della regione genomica di h-PRUNE sono state osservate in proporzioni simili in tumori con immunocolorazione di h-PRUNE positiva (155/576; 27%) o negativa (89/440; 20%), si può ipotizzare che siano coinvolti i pathway patogenici alternativi nell'aumento dell'espressione somatica della proteina h-PRUNE nel tumore alla mammella.

#### Valutazione della significatività prognostica per h-PRUNE e nm23-H1

Allo scopo di valutare se l'espressione somatica di h-prune e nm23-H1 mostrasse una significatività prognostica per il cancro alla mammella, i dati immunoistochimici sui tumori alla mammella primari invasivi di tutti i tipi e gradi sono stati sottoposti ad analisi statistica per fare una correlazione rispetto alla sopravvivenza totale. In un gruppo di pazienti, 653 (31%) erano morti con una sopravvivenza media dell'intero campione di 63 mesi e un follow-up medio di pazienti in vita

di 74 mesi.

Secondo le analisi con una variabile, l'immunocolorazione positiva di h-PRUNE ( $p=0.0037$ ) e PR ( $p=0.0072$ ) erano i parametri istopatologici che presentavano una associazione significativa con la sopravvivenza naturale. Quando il modello Cox è stato aggiustato con la fase della malattia (pT e pN) e l'età alla diagnosi, l'iperespressione di h-PRUNE rimaneva il solo marker in grado di agire come fattore predittivo indipendente ( $p=0.0092$ ; ratio del rischio, 1,65; intervallo di familiarità 95%, 1,46-1,88) (Tabella 5). Nella tabella 5 sono riportati i dati che dimostrano la correlazione esistente tra PRUNE, nm23-H1 e altri marker immunoistochimici rispetto alla sopravvivenza dei pazienti con cancro alla mammella.

Tabella 5

| Marker*          | Rapporto di rischio | 95% intervallo di sicurezza | P     |
|------------------|---------------------|-----------------------------|-------|
| h-PRUNE positivo | 1,65                | 1,46-1,88                   | 0,009 |
| nm23-H1 positivo | 1,13                | 0,95-1,34                   | 0,158 |
| ER positivo      | 1,01                | 0,86-1,18                   | 0,949 |
| PR positivo      | 1,08                | 0,91-1,29                   | 0,374 |

\*Tarati rispetto alla grandezza del tumore, lo stato dei noduli, l'età.

Come mostrato nella figura 10 (pannello A), non è stato trovato alcun valore prognostico per l'espressione della proteina nm23-H1 ( $p=0.258$ ). Una prognosi povera è stata invece osservata nei pazienti con tumori iperesprimenti la proteina h-PRUNE (pannello B); tale correlazione con il peggiore decorso clinico rimaneva statisticamente

significativo anche quando i casi erano stratificati secondo uno status nodale ausiliario che rappresenta il fattore prognostico più comune nel tumore alla mammella [ $p=0.023$ , per pazienti nodulo positivi (pannello C) e  $p<0.001$ , per pazienti nodulo negativi (pannello D)].

Nel presente studio è stata analizzata un'ampia serie di casi di carcinoma alla mammella (2109 pazienti) e nella maggior parte dei casi (1208; 57%) si osserva una iperespressione altamente specifica di h-PRUNE in cellule carcinomatose della mammella come determinato mediante analisi immunoistochimica su TMA (tissue multiple array) di questi campioni, in confronto ai livelli di espressione della proteina in campioni di cellule epiteliali sane (figura 1).

I casi h-PRUNE positivi sono distribuiti in modo uniforme tra i differenti sottogruppi di pazienti e non si osserva alcuna correlazione con fattori quali, ad esempio, il tipo di tumore, le dimensioni del tumore, lo stato dei noduli ascellari, l'interazione con recettori del progesterone o degli estrogeni. L'espressione di alti livelli della proteina h-PRUNE consente di ipotizzare un ruolo come fattore pronostico indipendente dell'invasività del cancro alla mammella. Questa ipotesi viene confermata da un successivo studio volto a stabilire la diretta correlazione tra l'iperespressione di h-PRUNE e la ridotta sopravvivenza dei pazienti affetti da cancro alla mammella, come mostrato nella tabella 5.

Quindi, tra i geni associati alla progressione tumorale si può includere il gene codificante per h-PRUNE associato alla prognosi avversa di cancro invasivo della mammella.

## BIBLIOGRAFIA

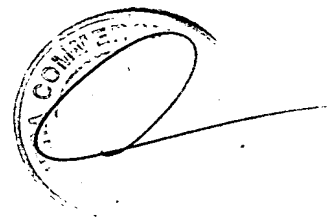
- Aravint, I. and Koonin, E.V. (1998). Trends in biochemical sciences 23, 17-19.
- Timmons, L. and Shearn, A., (1996). Genetics 144, 1589-1600.
- Lombardi, D., Lacombe, M.L. and Paggi, M.G., (2000). J. Cell Physiol 182, 144-149.
- Keen, J.C., Davidson, N.E., (2003). Cancer 97, 825-833.
- Domchek, S.M., Weber, B.L, (2002). Curr Opin Oncol 14, 589-593.
- Kuru, B., Camlibel, M., Ali Gulcelik, M., Alagol, H., (2003). J.Surg. Oncol 83, 167-172.
- Morabito, A., Magnani, E., Gion, M., (2003). Clin Breast Cancer 3, 381-390.
- Florenes, V.A., Aamdal, S., Myklebost, O., Maelandsmo, G.M. Bruland, O.S. and Fodstad, O., (1992). Cancer Res 52, 6088-6091.
- Steeg, P.S., (2003). Nat Rev Cancer 3, 55-63.
- Frejje, J.M., Blay, P., Macdonald, N.J., Manrow, R.E., and Steeg, P.S., (1997). J Biol Chem 272, 5525-5532.
- Hartsough, M.T., Clare, S.E., Mair, M., Elkaloun, A.G., Sgroi, D., Osborne, C.K., Clarke, G. and Steeg, P.S. (2001). Cancer Res 61,2320-2327.
- Frejje, J.M., Lawrence J.A., Hollingshead M.G., De la Rosa, A., Narayanan, V., Grever, M., Sausville, E.A., Paull, K., and Steeg P.S. (1997). Nat Med 3, 395-401.
- Kantor, J.D., Mc Cormick, B., Steeg, P.S., and Zetter, B.R., (1993). Cancer Res 53, 1971-1973.

- Leone A. , Flatow, U. , Van Houtte K., and Steeg P.S. (1993).  
Oncogene 8, 2325-2333.
- Howlett, A.R., Petersen, O.W., Steeg, P.S. and Bissell M.J. (1994).  
J Natl Cancer Inst 86, 1838-1844.
- Hartsough , M.T. , and Steeg P.S., (1998). Am J Hum Genet 63, 6-10.
- Lombardi D., L.M.L., Paggi M.G., (2000) J. Cell Physiol. 182, 144-149.
- Hartsough M.T. and Steeg P.S. (2000). J. Bioenerg Biomembr 32, 301-308.
- Mao, H., Liu, H., Fu, X., Fang, Z., Abrams, J., and Worsham, M.J. (2001). Int J Oncol 18, 587-591.
- Tseng Y. H., Vicent, D., Zhu, J., Niu, Y., Adeyinka, A., Moyers, J.S., Watson, P.H., and Kahn, C.R. (2001). Cancer Res 61, 2071-.2079.
- Reymond A., Volorio, S., Merla, G., Al- Maghteh, M., Zuffardi, O., Bulfone A., Ballabio A., and Zollo, M., (1999). Oncogene 18, 7244-7252.
- Forus A., D'angelo A., Henriksen, J., Merla , G., Maelandsmo, G.M. Florenes, Y.A., Olivieri S., Bjerkehagen, B., Meza-Zepeda, L.A., Del Vecchio Blanco, F., Muller, C., Sanvito F., Kononen, J., Nesland, J.M. Fodstad O., Reymond A., Kallioniemi, O.P., Arrigoni G., Ballabio A., Myklebost, O., and Zollo M., (2001). Oncogene 20, 6881-6890.
- Altshul, S.F., Madden, T.L., Schäffer A.A., Zhang Z., Miller W., and Lipman, D.J. (1997). Nucleic Acids Research 25, 3389-3402.

- Notredame C., Higgins D.G., and Heringa J., (2000). J Mol Biol 302-205-217.
- Macdonald , N.J., Freije, J.m.p, Stracke, M.L., Manrow R.E., and Steeg, P.S. (1996). J. Biol Chem 271, 25107-25116.
- Garzia, L., Andre' A., Amoresano. A., D'angelo, A., Martusciello R., Cirulli, C., Turumi, T., Marino G., and Zollo M., (2003). Biotechniques vol 35, 384-391.
- Fisher D.A., Smith, J.F., Pillar, J.S., St Denis, S.H. and Cheng , J.B. (1998). J Biol Chem 273, 15559-15564.
- Leone, A., Seeger R.C., Hong C.C.M., Hu, Y.Y., Arboleda M.J. Brodeur G.M., Stram, D., Slamon D.J., and Steeg, P.S. (1993). Oncogene 8, 855-865.
- Yamagata, A., Kakuta, Y., Masui, R. and Fukuyama, K. (2002). Proc Natl Acad Sci Usa 99, 5908-5912.
- Ahn, S., Milner, A. J., Futterer, K., Konopka, M., Ilias, M., Young T.W. , and White S.A. (2001). J. Mol Biol 313, 797, 811.
- Aravind L., and Koonin E.V. (1998). Trends Biochem Sci 23, 469-472.
- Aravind L., and Koonin E.V. (1998). Nucleic Acids Res 26, 3746-3752.
- Galperin M.Y., Natale D.A., Aravind L., and Koonin E.V. (1999). J. Mol Microbiol Biotechnol 1, 303-305.
- Aravind L., (1999) . In Silico Biol 1, 69-91.
- Hejna, M., Raderer M., and Zielinsky, C.C. (1999). J Natl Cancer Inst 91, 22-36.

- UN MANDATARIO**  
*per se e per gli altri*  
**Serena Gitto**  
(N° d'iscr. 962 B)

Serene Gidd





RM 2003 A 000572

RIVENDICAZIONI

1. Uso di inibitori dell'attività fosfodiesterasica nucleotide ciclica di h-PRUNE per la preparazione di un medicamento per la prevenzione ed il trattamento delle metastasi dei tumori caratterizzati da una iperespressione di h-PRUNE.
2. Uso secondo la rivendicazione 1, in cui gli inibitori dell'attività fosfodiesterasica nucleotide ciclica di h-PRUNE sono scelti dal gruppo che consiste in dipiridamolo, vinpocetina, 3-isobutil-1-metilxantina, e loro derivati, analoghi strutturali ed isomeri.
3. Uso secondo ognuna delle rivendicazioni precedenti, in cui i tumori caratterizzati da un'iperespressione di h-PRUNE sono il carcinoma alla mammella, il sarcoma, il neuroblastoma ed il melanoma.
4. Metodo di screening di composti inibitori di h-PRUNE comprendente le seguenti fasi:
  - a) scelta di almeno un composto inibitore delle fosfoesterasi (PDE) o un suo derivato, analogo strutturale, isomero;
  - b) somministrazione di detto almeno un composto ad una concentrazione compresa tra 0,05  $\mu\text{M}$  e 10  $\mu\text{M}$  ad una linea cellulare iperesprimente h-PRUNE;
  - c) analisi quantitativa dell'attività fosfodiesterasica nucleotide ciclica di h-PRUNE e/o analisi della motilità cellulare in funzione della concentrazione di detto almeno un composto.
5. Metodo secondo la rivendicazione 4, in cui la linea cellulare è scelta dal gruppo che consiste in MDA-C100, MDA-prune, MDA-prune $\Delta$ , MDA-prune4D $\Delta$ , MDA-PDE5A, MDA-H1-177, MDA-nm23H1-

RM 2003 A 000572

6. Metodo secondo ognuna delle rivendicazioni 4 e 5, in cui l'analisi quantitativa è condotta mediante test di idrolisi del substrato c-AMP e/o c-GMP.

8. Metodo per la preparazione di una composizione farmaceutica comprendente il metodo secondo le rivendicazioni da 4 a 7 che comprende ulteriormente la fase d) di miscelazione di almeno un composto identificato, o un suo derivato o un suo analogo strutturale o un suo isomero, assieme ad uno o più coadiuvanti e/o eccipienti farmacologicamente accettabili.

10. Uso secondo la rivendicazione 9, in cui i tumori caratterizzati da un'iperespressione di h-PRUNE sono il carcinoma alla mammella, il sarcoma, il neuroblastoma ed il melanoma.

12. Metodo secondo la rivendicazione 11, comprendente le seguenti

fasi:

- a) mettere in contatto detto campione biologico con almeno un anticorpo anti-h-PRUNE;
- b) rivelazione del complesso antigene-anticorpo;
- c) analisi quantitativa del complesso antigene-anticorpo.

13. Metodo secondo la rivendicazione 12, in cui detto campione biologico è una sezione di tessuto o un fluido biologico.

14. Metodo secondo ognuna delle rivendicazioni da 11 a 13, in cui detto anticorpo anti-h-PRUNE è un anticorpo monoclonale o un anticorpo policlonale.

15. Metodo secondo ognuna delle rivendicazioni da 11 a 14, in cui detto anticorpo anti-h-PRUNE è marcato con un radioisotopo, una molecola fluorescente o un enzima.

16. Metodo secondo la rivendicazione 12, in cui dette rivelazione e analisi quantitativa del complesso antigene-anticorpo vengono effettuate mediante analisi immunoistochimica, immunoprecipitazione, immunofluorescenza, ELISA, immunoblotting.

17. Metodo secondo la rivendicazione 11, in cui i primer per la PCR Real-time specifici per h-PRUNE comprendono le sequenze:

5'-AGAGATCTTGGACAGGCAAAC-3';

3'-CCATGTTGACACAGTCCAGGAT-5';

o sequenze ad esse complementari.

18. Metodo secondo la rivendicazione 11, in cui la sonda marcata per la PCR Real-time o per l'ibridazione *in situ* comprende la sequenza oligonucleotidica:

AS  
VIA  
C  
A  
S  
P  
A



19. Metodo secondo la rivendicazione 18, in cui detta sonda marcata per PCR Real-time è lineare o circolare.
20. Metodo secondo ognuna delle rivendicazioni 18 e 19, in cui detta sonda è marcata con almeno un radioisotopo e/o un fluorocromo.
21. Metodo secondo ognuna delle rivendicazioni da 18 a 20, in cui detta sonda è marcata con almeno un fluorocromo in 5' e/o in 3'.
22. Metodo secondo ognuna delle rivendicazioni da 18 a 21, in cui detto fluorocromo è 6 carbossi-fluoresceina.
23. Kit diagnostico per la rivelazione di h-PRUNE in un campione biologico per la diagnosi delle metastasi dei tumori caratterizzati da una iperespressione di h-PRUNE comprendente almeno un anticorpo anti-h-PRUNE, o una coppia di primer specifici per h-PRUNE o una sonda oligonucleotidica marcata specifica per h-PRUNE.
24. Kit diagnostico secondo la rivendicazione 23, in cui i tumori caratterizzati da un'iperespressione di h-PRUNE sono il carcinoma alla mammella, il sarcoma, il neuroblastoma ed il melanoma.
25. Kit diagnostico secondo ognuna delle rivendicazioni 23 e 24, in cui detto anticorpo anti-h-PRUNE è un anticorpo monoclonale o un anticorpo policlonale.
26. Kit diagnostico secondo la rivendicazione 25, in cui detto anticorpo anti-h-PRUNE è marcato con un radioisotopo, una molecola fluorescente o un enzima.

27. Kit diagnostico secondo la rivendicazione 23, in cui detta coppia di primer specifici per h-PRUNE comprende le sequenze:

5'-AGAGATCTTGGACAGGCAAAC-3';

3'-CCATGTTGACACAGTCCAGGAT-5';

o sequenze ad esse complementari.

28. Kit diagnostico secondo la rivendicazione 23, in cui la sonda oligonucleotidica marcata per PCR Real-time o per l'ibridazione *in situ* comprende la sequenza oligonucleotidica:

CTGCATGGAACCATC

o la sequenza ad essa complementare o la sequenza in cui T è sostituita da U.

29. Kit diagnostico secondo la rivendicazione 28, in cui detta sonda oligonucleotidica marcata per PCR Real-time è lineare o circolare.

30. Kit diagnostico secondo ognuna delle rivendicazioni 28 e 29, in cui detta sonda oligonucleotidica è marcata con almeno un radioisotopo e/o un fluorocromo.

31. Kit diagnostico secondo ognuna delle rivendicazioni da 28 a 30, in cui detta sonda è marcata con almeno un fluorocromo in 5' e/o in 3'.

32. Kit diagnostico secondo la rivendicazione 31, in cui il fluorocromo è 6-carbossifluoresceina.

33. Anticorpo monoclonale murino in grado di riconoscere e legare in modo selettivo la proteina h-PRUNE ricombinante caratterizzato dal fatto di appartenere alla classe delle immunoglobuline IgM e di essere prodotto da un clone scelto dal gruppo che consiste in 4G3, 4G3/3, 4G3/4, 2C/3, 2C3/2, 2E10 e 3H6.

34. Anticorpo policlonale da coniglio per h-PRUNE caratterizzato dal fatto di riconoscere e legare in modo selettivo il peptide utilizzato per l'immunizzazione comprendente la sequenza amminoacidica:

NH<sub>2</sub>-Ala-Leu-Glu-Glu-Ala-Val-Ala-Glu-Val-Leu-Asp-His-Arg-Pro-Ile-Glu-Pro-Lys-COOH

o parti di essa.

35. Primer specifici per l'amplificazione mediante PCR Real-time di h-PRUNE comprendenti almeno una delle sequenze oligonucleotidiche:

5'-AGAGATCTTGGACAGGCAAAC-3';

3'-CCATGTTGACACAGTCCAGGAT-5';

o sequenze ad esse complementari.

36. Sonda oligonucleotidica specifica per h-PRUNE per la PCR Real-time o per l'ibridazione *in situ* comprendente la sequenza:

CTGCATGGAACCATC

o la sequenza ad essa complementare o la sequenza in cui T è sostituita da U.

37. Sonda oligonucleotidica secondo la rivendicazione 36, in cui detta sonda è lineare o circolare.

38. Sonda oligonucleotidica secondo ognuna delle rivendicazioni 36 e 37, in cui detta sonda oligonucleotidica è marcata con almeno un radioisotopo e/o un fluorocromo.

39. Sonda oligonucleotidica secondo ognuna delle rivendicazioni da 36 a 38, in cui detta sonda è marcata con almeno un fluorocromo in 5' e/o in 3'.

40. Sonda oligonucleotidica secondo la rivendicazione 39, in cui il fluorocromo è 6-carbossifluoresceina.

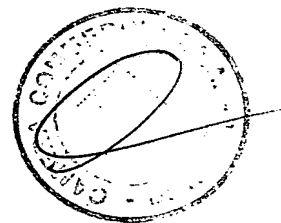
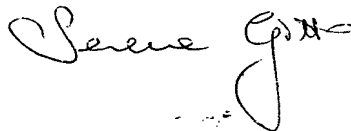
Roma, 1 1 DIC. 2003

p.p. : Fondazione Telethon

ING. BARZANÒ & ZANARDO ROMA S.p.A.

SG/IC

UN MANDATARIO  
per se e per gli altri  
Serena Gitto  
(N° d'iscr. 962 B)



ING. BARZANÒ & ZANARDO ROMA S.p.A.

RM 2003 A 000572  
1/10

| A            | Motivo 1                    | Motivo 2                 | Motivo 3           | Motivo 4                                            |
|--------------|-----------------------------|--------------------------|--------------------|-----------------------------------------------------|
| Rv2837c_Mt   | VGVYCHVHFACTIGAGLALALVLDGCG | [35] VDLVTVTPSPVDRLGALG  | [6] RELVLDHHSND    | [10] SADSTTTMVAEILDANGKPIDPRVAHCIYAGLATITGSRFWSAV   |
| s111253_Ssp  | DLILCHQTAFVILGAAGVLAKLHPCSR | [34] IRSIYTVVQOQDRLGKAA  | [8] RQVAITDHHNSP   | [11] AVGASTTLIVEKLQADISLSMVEASVMALGIHVSTGSLTFTQT    |
| MGPA_Mg      | IVIFRHVRPDCIGAQOGLPHLIKANP  | [32] EALATVVCANYKNRIELRE | [7] KAVLRIDHHPNED  | [11] SYVACCEQIVEMATVAKMTIPPVAATLLYIGYTTSSNRFLYSMT   |
| YTQI_Bs      | IILRHVRHFPAYGSOQGLTEILRETY  | [30] GALVTVCTANQERIDQOR  | [4] AKLAKIDHHPNED  | [13] SVSEMIYELVLEGKEHGWKLNTKAAELIYAGIVGTGRFLFPNT    |
| AF2029_Af    | LGITFDHNPFCSSMSAYALREIAKQFD | [37] YDAFALVSSSGPVNNSIP  | [3] DISIVTDHHPAEK  | [10] DVGATATILTEYIKELKITPSKILALATLFFGIKSTDEPKRMT    |
| MJ0977_Mj    | NKILIVTHITFGLTSRAILQKLAERLN | [23] YDLITFALGSGQLKNIKE  | [11] DKIIITDHHQPEE | [18] GAEICGAGSVYLFKAIINNDWIDLAKYAVLGAAGVSIQNIIEGKLI |
| MJ1198_Mj    | RPIIRHHAFTCYGCGIALEKAILPII  | [46] LPLIVLITNGSTDEIPAI  | [7] IEVIVTDHHPGE   | [85] KGRTYDREYLEKIALCMDFEAFYLRFDGKGIYDILATNIKEF     |
| HP1042_Hp    | MOVYHLSHIELGYACQLVSKQFPKNIQ | [27] EPLIYLSLNLNLNWEAYL  | [13] IQIQLDHHISGK  | [19] IVYBFLKHYAILEPKNTWLEPLVEMVNSVDITWQGYGFLG       |
| RecJ_Hi      | QKIYIVGDFPAGATSTALSVALRQLG  | [31] VOLIATVNGVSSFDGVAP  | [5] IRVLYTDHHPPE   | [33] LAVRAKFRLEGIFTAETQPNFTDLLDLVALGTIAVWPLDQNNR    |
| RecJ_Hp      | TEILVVGDIYAGVSSAIMAKFPESLN  | [27] APLIITVNGINAFEAARF  | [5] YTLIITDHHCLH   | [27] LVAFYLCYGIHQLLGKEKSHSSELCLAGVATIAEMPLTFFNR     |
| RecJ_Ssp     | KKVINGDFPAGITSTAVLWEGLGQFF  | [32] TKLIITVCTGSTMDEIVY  | [5] MDVITDHHPLD    | [27] VAFKLVEALYNQYPTVPQPLEDLDLVAIGLIAVLTVLQDCR      |
| YYBQ_Bs      | ILLFGHNPFTICSAIAYADLNKILG   | [36] VNGVILVNERQOSIKDI   | [3] QVLEVTDHHPRIAN | [12] PVGCTATILNMKYKENVKIEKEIAGLMLSAIISLFLKSPTC      |
| ICRA_Sg      | ILVFGHNPFTSAGISSYAPAYLAREAY | [38] AEQVILVNEFQOSVADI   | [3] EVYGVTDHHPVAN  | [12] PVGSASSIVYRMFKHSHVAVSKEIAGLMLSLGLSTLLKSPPT     |
| Y608_Mj      | RYYVGHKNPFTSASATVLAFLDCYP   | [31] GKEIILVHSEKQSQFDL   | [3] KLIAITDHHKVGL  | [19] IAEIYKDAIDLIGGKKELKPLDGLLLSAIISPTVLKSPPT       |
| AF0756_Af    | VYYVGHKNPFTSVCSAIAPAYLWKNWK | [46] GKVALVHSEKAQTVGDI   | [3] EVVATDHHKIGD   | [12] PVGCTATVILKLFDKTGEIIPKDIAGILLSSILSTVIFKSATT    |
| U60409_Lm    | TVVQGNEGDPSIVGCIYLAMLPDQK   | [44] QIAENLVHIALNASVLY   | [14] RVGVVTDHHPDEQ | [11] LRTVGSACTLVTELYRECGEDVVCPTLTAIYVLTYNFEPQAK     |
| PPX1_Sc      | TICVGNESADPSIASAITYSYQYIYN  | [62] ELNGLVGNNDTPKLNKNY  | [2] NVVGIIDHHPDLQ  | [14] SCSSLVFNWYKELQGDREVVMNIAPLLMGAIIIDTSNMRKVE     |
| PRUNE_Dm     | HLVGNESCLPSAVSAVTLPVYAQRH   | [48] DVNVILVHVSPLAPNVT   | [1] NVTEIDHHPLED   | [18] SVGSCATLVAQRYLAEDQPRSTVSQALLHATVLTINFPAPAK     |
| h-prune.1_Hs | HVVLGNESCLPSVSAVALAPYLAQTT  | [52] QLTILVHSHILSKSDTAL  | [2] AVAEVTDHHPPEP  | [12] LVGSCATLVTERILQGAPEILDRTAALLHGTIILCVNMDLKIG    |

| Motivi specifici                             | Gis     |
|----------------------------------------------|---------|
| Rv2837c_Mt [107] TVNLAAVASGPGGCHRLAAGYTTGS   | 1648883 |
| s111253_Ssp [123] DDTLTQLLEPYGGGHAQAAAVNLRDV | 1653244 |
| MGPA_Mg [102] GINVRDIAIKYGGCHENNASGAIITNK    | 1045875 |
| YTQI_Bs [103] GPVINGLARKYNGGHPPLASGASIYSW    | 2293259 |
| AF2029_Af [102] EVLRRAPGVDGSAQCHAHAGAQIPLG   | 2648507 |
| MJ0977_Mj [254] AIKYASEKVGSGGCHKFAAGYIPDN    | 2128614 |
| MJ1198_Mj [109] QLMEEIPEASLDGCHECAGSLKFVEG   | 2128720 |
| HP1042_Hp [137] CDVCELSQWCFNGGCHRNASGGKIDGP  | 2314198 |
| RecJ_Hi [168] RIHSQHPNHLKPGCHAMAAGLSIREB     | 1172895 |
| RecJ_Hp [155] DALNGVSSILLGYCHQACGLSVEKN      | 2313437 |
| RecJ_Ssp [165] ALLHSQRHMLGFGCHPFAAGLSLPLD    | 1652638 |

Famiglia 1

|                                        |                            |          |
|----------------------------------------|----------------------------|----------|
| YYBQ_Bs [31] DLSKKTVEELISLDAKEFTLG     | [75] TALLKGVSRKKQVVPVLT    | 586817   |
| ICRA_Sg [31] NLASKABELIDIDAKTEFLN      | [75] HAFLAGVSRKKQVVPOLTE   | 1743856  |
| MJ0608_Mj [32] VVGKLKPEELINMDFKNFDN    | [74] SVFLEGVSRKKQVVPPLER   | 1591318  |
| AF0756_Af [32] AVDDLAMDIKRDYKDFMS      | [75] SVNLDGVSRKKQVVPPELE   | 11498362 |
| L2759.9_Lm [36] DVIALSVQILRRDYKQPSFK   | [105] YSLSDPSISRRK-LVPALSE | 1407725  |
| PPX1_Sc [41] DIKGPSVSDILKKDYQFNQ       | [97] MFKQLNVEATRKQVVPYLEE  | 730369   |
| PRUNE_Dm [37] DISKLTFLTEVLRKDMKVLQTD   | [97] LRQHNQATRKH-ILPIVIR   | 1079081  |
| h-prune.1_Hs [34] DVSGLTTEQMLRKDKTIYRQ | [94] YLGNTQVSRKK-LPLLEQE   | 11245938 |

Famiglia 2

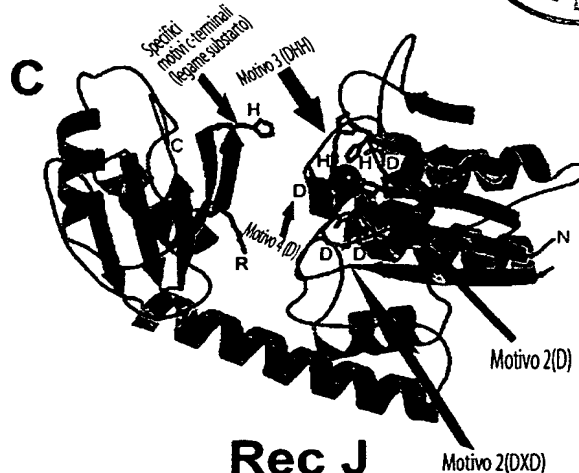
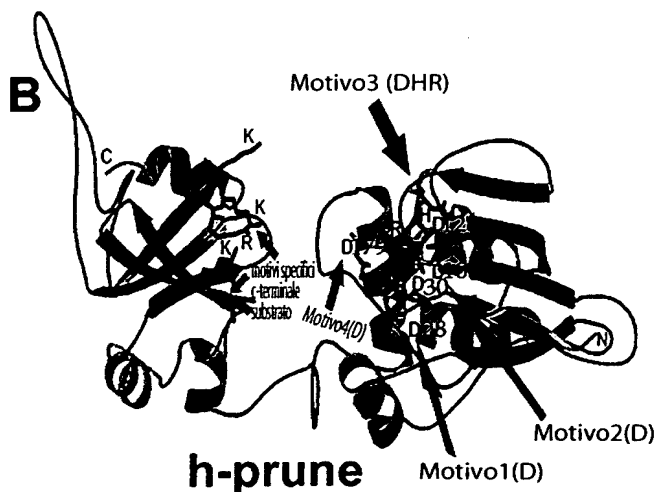
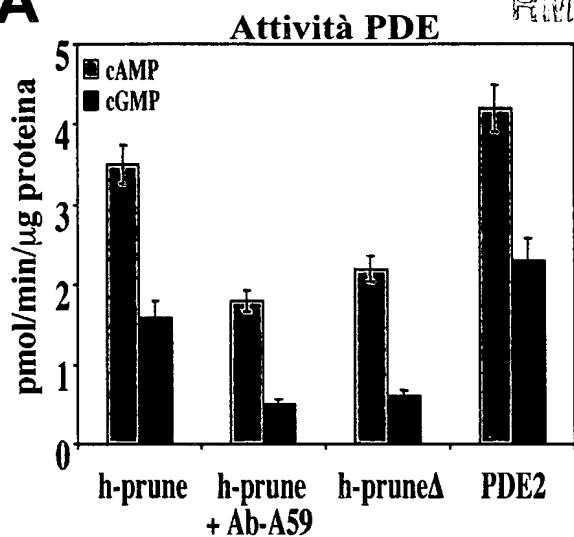


Fig. 1

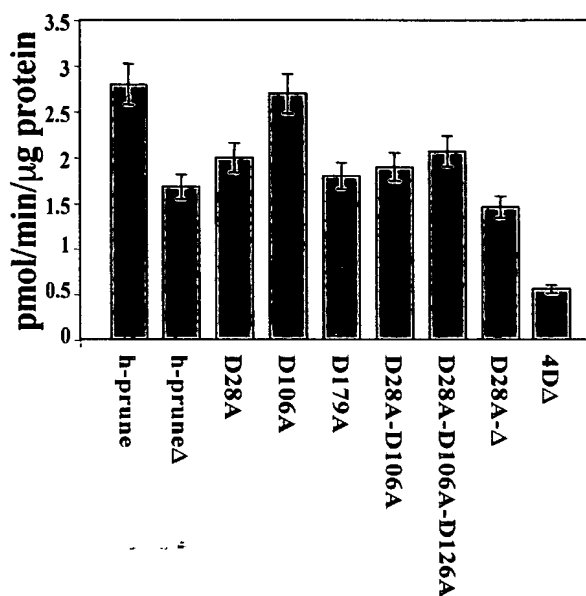


**A**

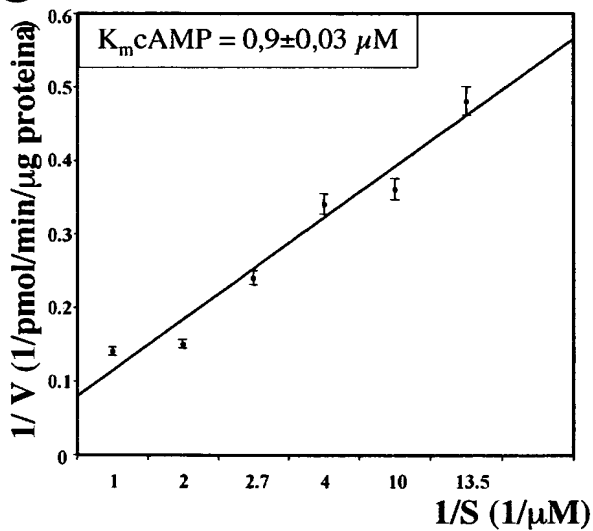


2/10  
RM

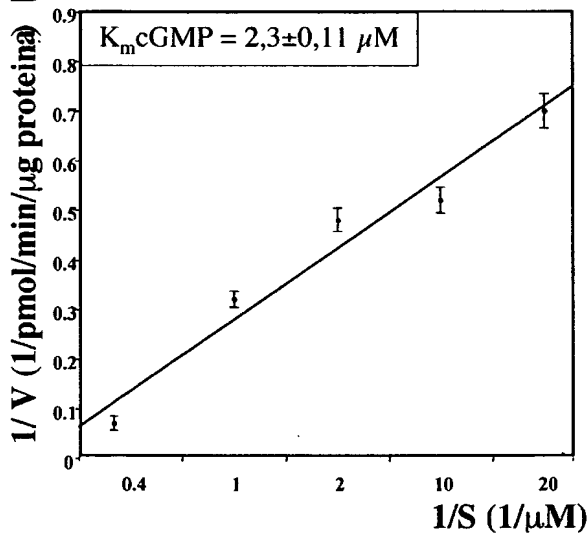
**B003 A 000572**



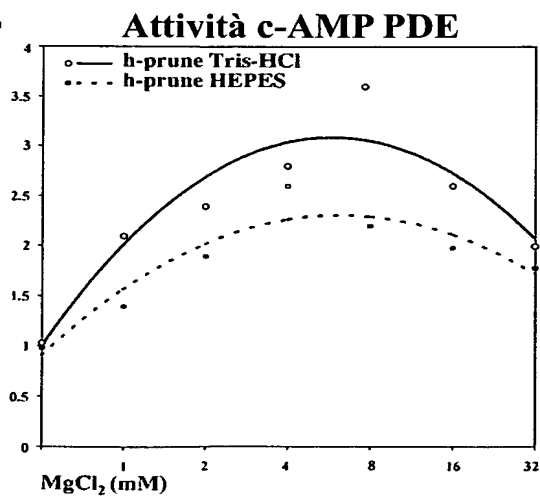
**C**



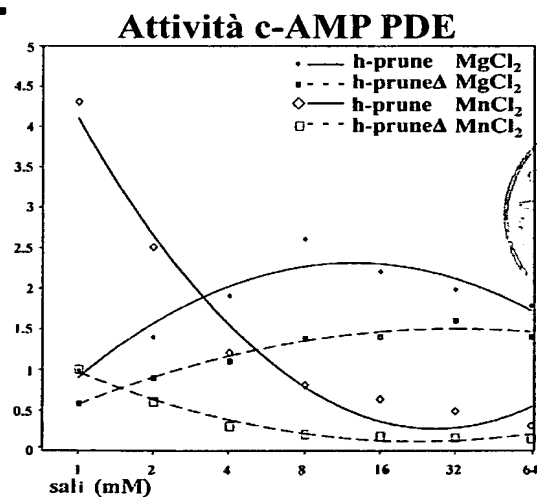
**D**



**E**



**F**



**Fig. 2**

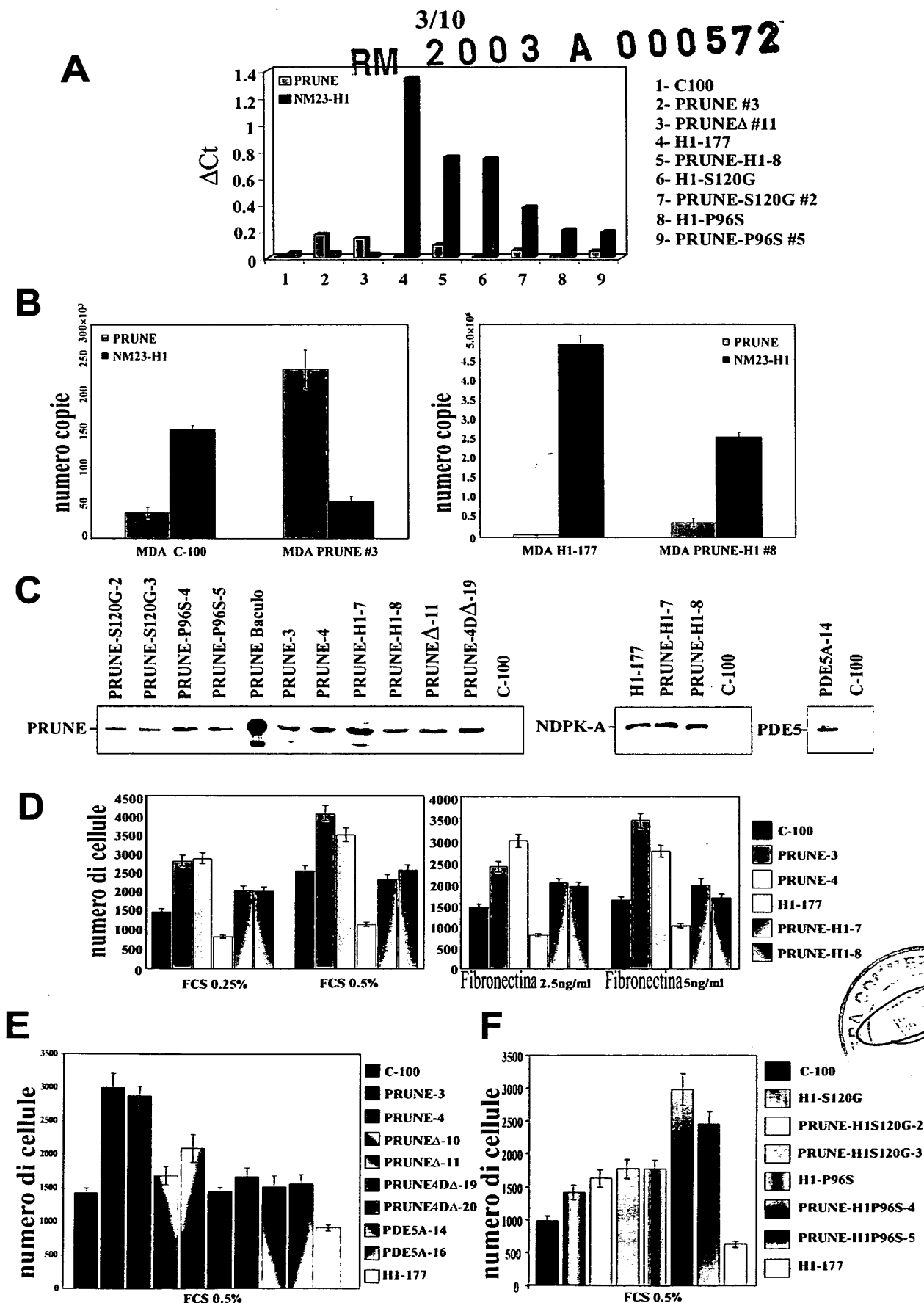
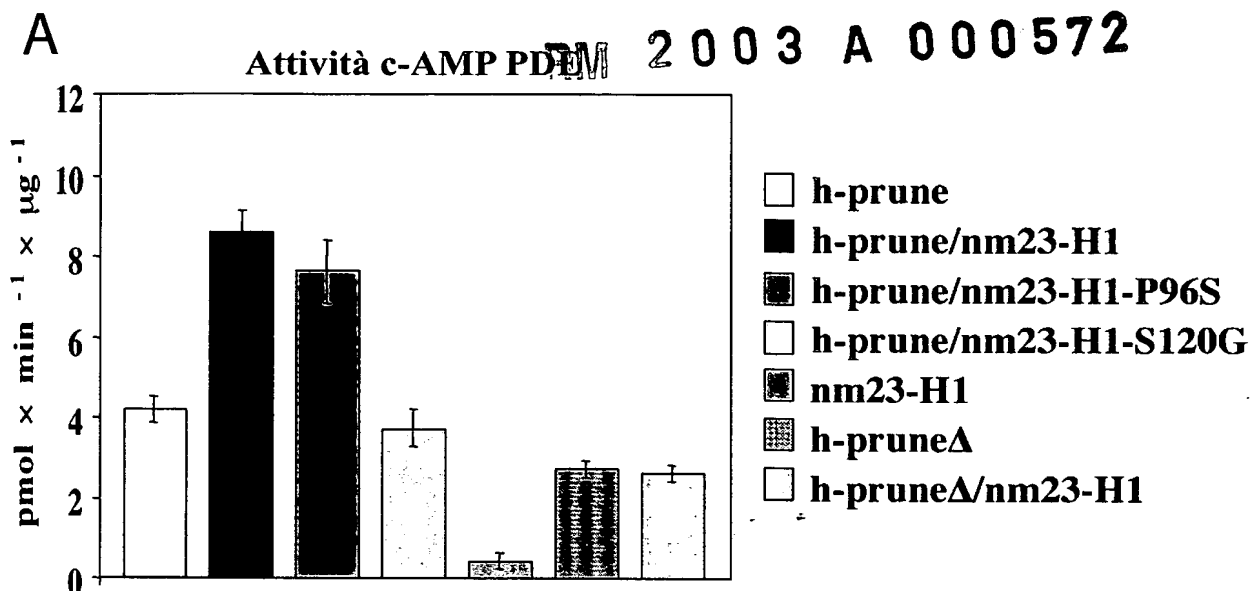


Fig. 3

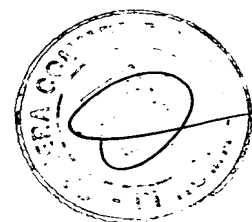
4/10



**B**

| nome clone           | Attività PDE h-prune<br>(pmol×min <sup>-1</sup> ×µg <sup>-1</sup> ) | Motilità<br>numero di cellule |
|----------------------|---------------------------------------------------------------------|-------------------------------|
| MDA C-100            | 3.8±0.7                                                             | 1548±84                       |
| MDA H1-177           | 2.2±0.4                                                             | 928±73                        |
| MDA PRUNE #3         | 35±5.3                                                              | 2812±294                      |
| MDA PRUNE #4         | 28.7±2.5                                                            | 3272±271                      |
| MDA PRUNEΔ #10       | 16.8±1.2                                                            | 1682±64                       |
| MDA PRUNEΔ #11       | 14.6±0.9                                                            | 2087±97                       |
| MDA PRUNE-H1 #7      | 18.8±2.6                                                            | 2048±93                       |
| MDA PRUNE-H1 #8      | 22±4.2                                                              | 2006±87                       |
| MDA H1S120G          | 2.4±0.8                                                             | 1328±54                       |
| MDA PRUNE-H1S120G #2 | 4.4±1.6                                                             | 1624±89                       |
| MDA PRUNE-H1S120G #3 | 5.3±1.4                                                             | 1767±108                      |
| MDA H1P96S           | 3.0±0.3                                                             | 1742±38                       |
| MDA PRUNE-H1P96S #4  | 19.2±0.3                                                            | 2982±184                      |
| MDA PRUNE-H1P96S #5  | 11.6±0.4                                                            | 2448±143                      |

**Fig. 4**



*Serena Gitto*

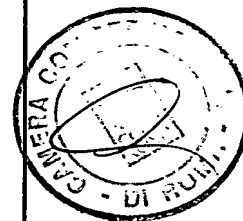
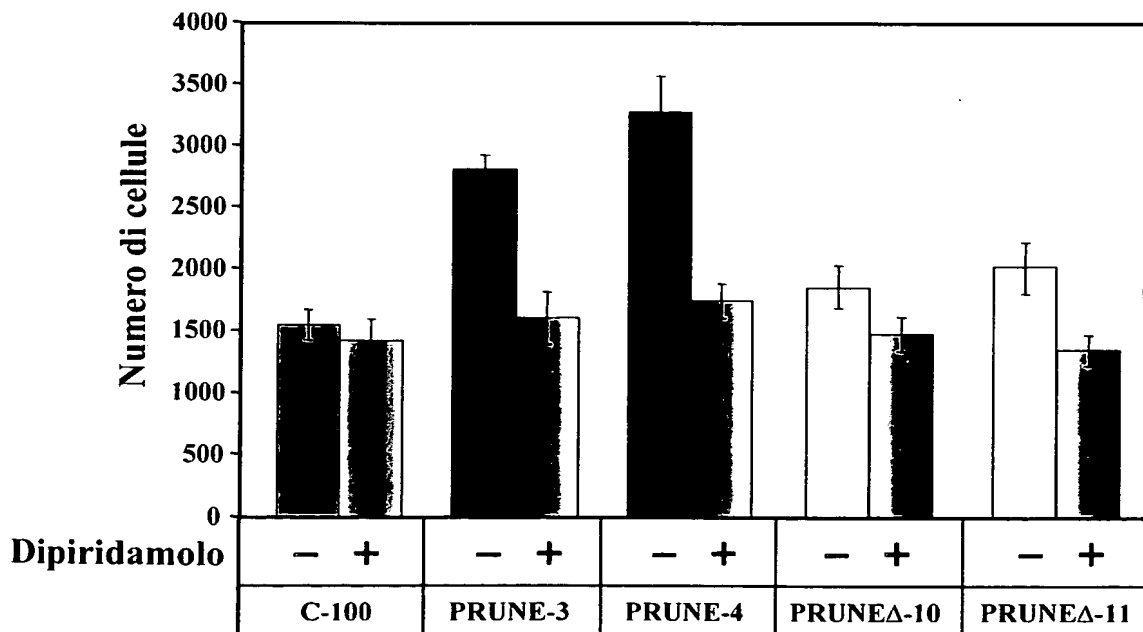
UN MANDATARIO  
per se e per gli altri  
Serena Gitto  
(N° d'iscr. 962 B)

5/10

**A**

| Inibitore    | Selettivo per un tipo PDE | IC <sub>50</sub> μM   | h-prune IC <sub>50</sub> μM |
|--------------|---------------------------|-----------------------|-----------------------------|
| Cilostamide  | PDE3                      | 0.05                  | >100                        |
| Dipiridamolo | PDE5/6/9/10/11            | 0.9/0.38/4.5/1.1/0.37 | 0.78±0.05                   |
| IBMX         | non selettivo             | 2-59                  | 40.2±0.8                    |
| Milrinone    | PDE3                      | 1.3                   | >100                        |
| Rolipram     | PDE4                      | 2.0                   | >100                        |
| Vinpocetina  | PDE1C                     | 8.1                   | 22.3±1.1                    |
| Zaprinast    | PDE1/5/6                  | 6.9/0.76/0.15         | >100                        |
| Sulindac     | cGMP PDEs                 | —                     | >100                        |

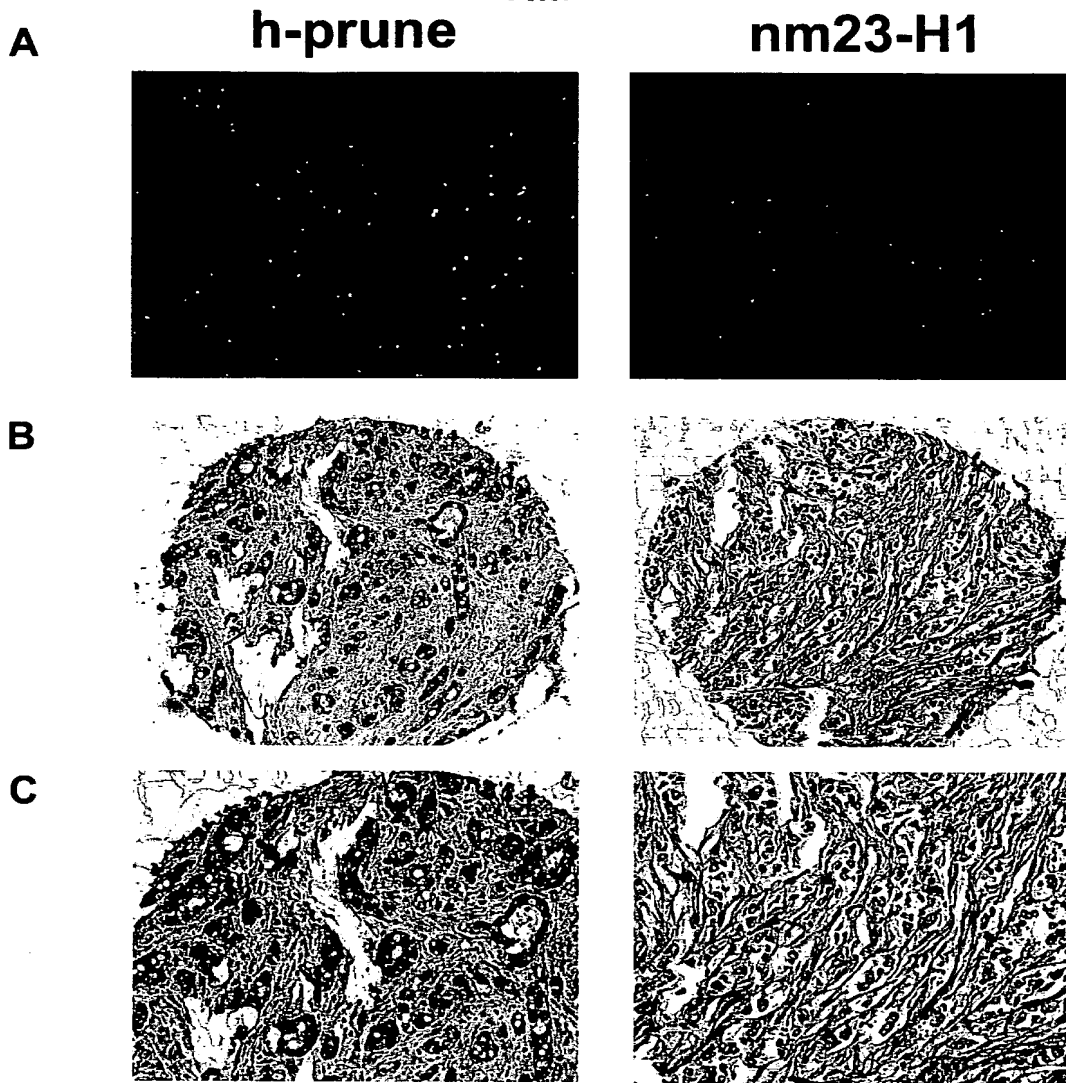
**B**



**Fig. 5**

*Serena Gatto*

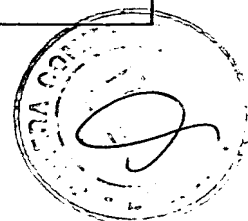
6/10 RM 2003 A 000572



**D**

| Immunoistochimica<br>(IHC)             | Grado<br>IHC      | Analisi Fish         |               |                     |               |
|----------------------------------------|-------------------|----------------------|---------------|---------------------|---------------|
|                                        |                   | PAC h-prune (1q21.3) |               | PAC nm23-H1 (17q21) |               |
|                                        |                   | Disomia              | Trisoma o più | Disomia             | Trisoma o più |
| <b>h-prune</b>                         | +++ / ++<br>+ / 0 | 7 (12%)<br>30 (51%)  | 22 (37%)      |                     |               |
| <b>nm23-h1</b>                         | +++ / ++<br>+ / 0 |                      |               | 1 (2%)<br>54 (98%)  |               |
| <b>casi analizzati TNM<sub>I</sub></b> |                   | <b>59</b>            |               | <b>55</b>           |               |

**Fig. 6**



*Serena Gitto*

UN MANDATARIO  
per se e per gli altri  
Serena Gitto  
(N° d'iscr. 962 B)

7/10 RM 2003 A 000572

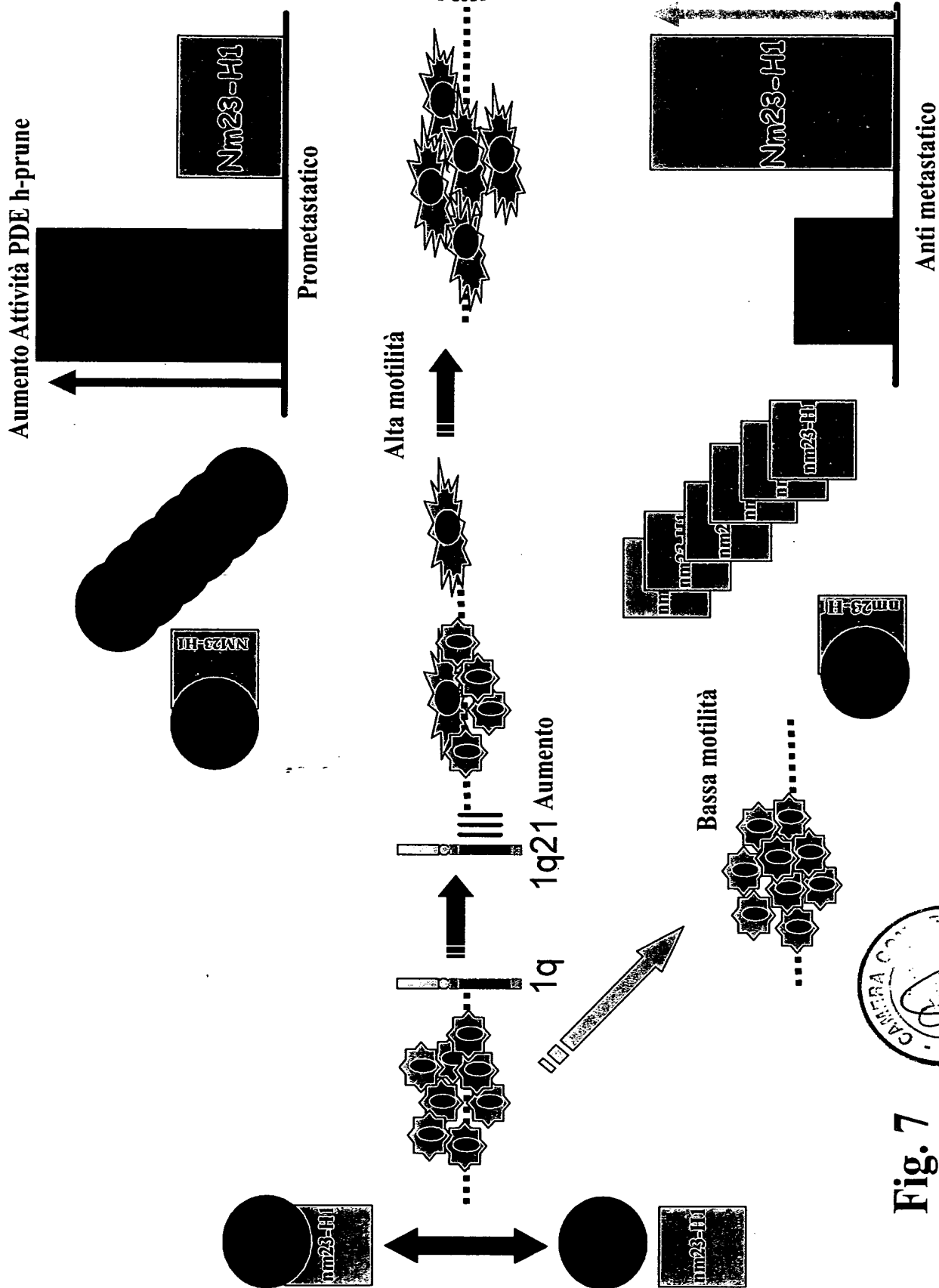


Fig. 7

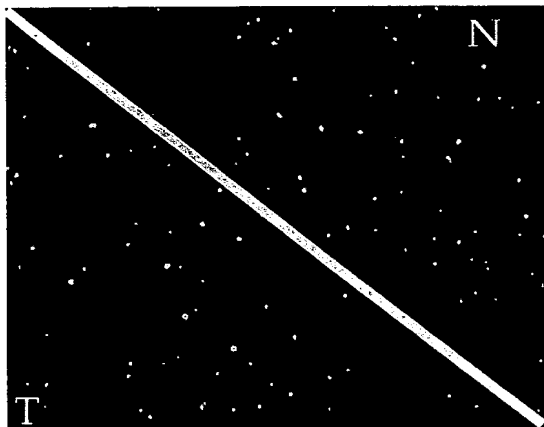
*Serena Gatto*

UN MANDATARIO  
per se e per gli altri  
**Serena Gatto**  
(N° d'iscr. 962 B)

8/10

RM 2003 A 000572

**A**



Tessuto normale e tumorale

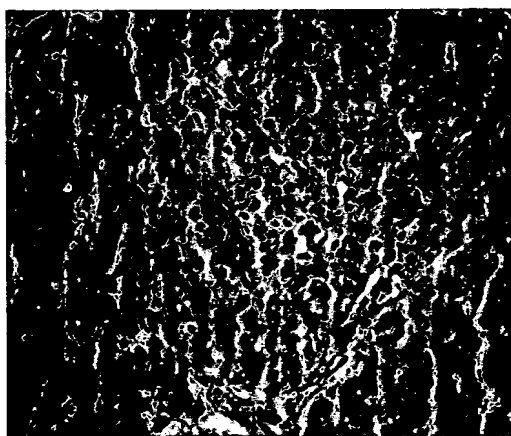


Tessuto tumorale  
(non metastatico)

**B**

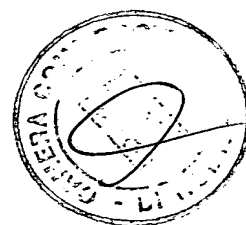


Tessuto Normale



Tessuto tumorale  
(non metastatico)

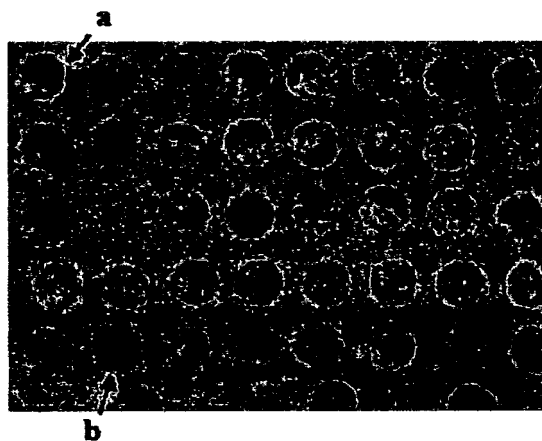
Fig. 8



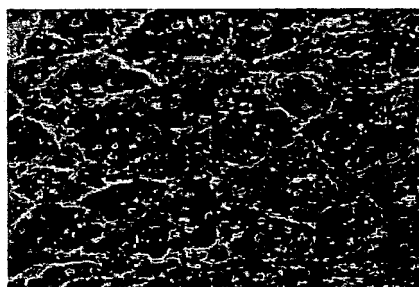
9/10

RM 2003 A 000572

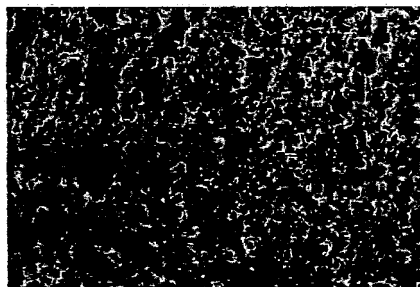
A



a



b



B

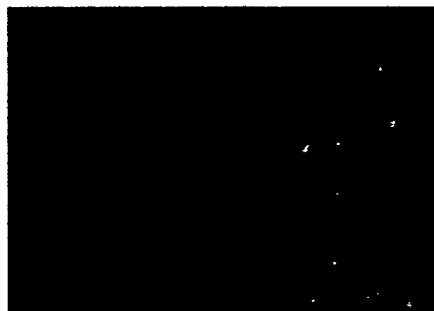
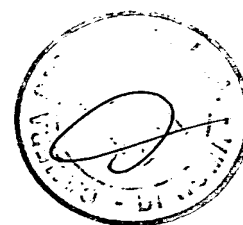


Fig. 9

UN MANDATARIO  
per se e per gli altri  
Serena Gitto  
(N° d'iscr. 962 B)

p.p.: Fondazione Telethon  
Ing. Barzanò & Zanardo Roma S.p.A.

*Serena Gitto*





RM 2003 A 000572

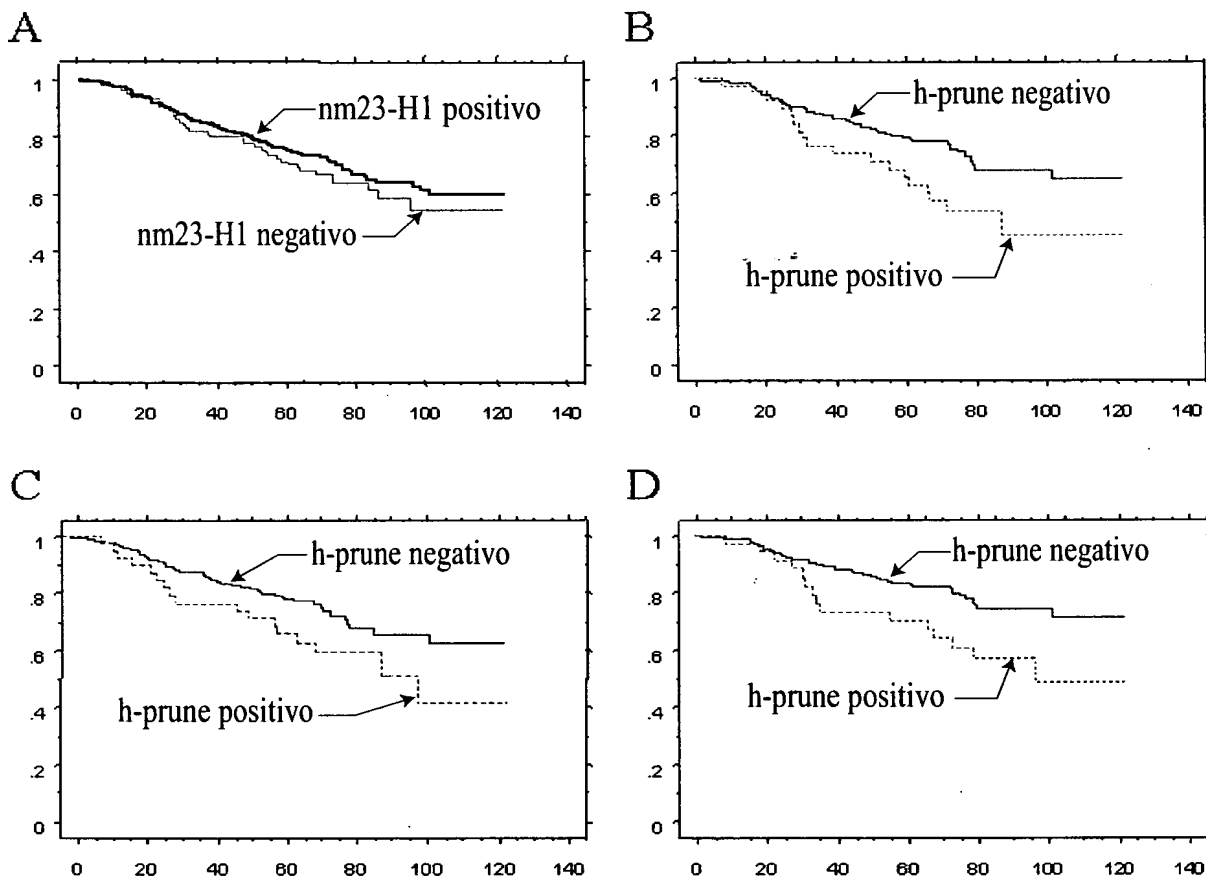
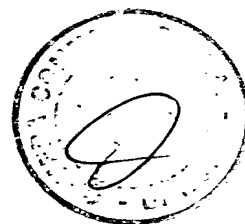


Fig. 10



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**